

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kristýna Čunátová**

Úloha jaderně kódovaných podjednotek cytochrom *c* oxidázy  
Role of nuclear-encoded subunits of cytochrome *c* oxidase

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Mgr. Petr Pecina, Ph.D.

Praha, 2016

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.05.2016

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala především svému školiteli, Mgr. Petru Pecinovi, Ph.D., který mi byl velmi ochotný poskytovat cenné rady a pomáhat při psaní této práce. Rovněž děkuji celému oddělení Bioenergetiky, které mi vytváří příjemné prostředí pro získávání nových poznatků z teorie i z laboratorní praxe. V neposlední řadě děkuji celé své rodině za podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout a svému příteli Jiřímu Veltruskému za nekonečnou trpělivost.

## Abstrakt

Cytochrom *c* oxidáza (COX) je terminálním enzymem mitochondriálního elektron-transportního řetězce a její funkcí je přenos elektronů ze substrátů na terminální akceptor kyslík. Rovněž se spolupodílí s dalšími enzymy na tvorbě protonového gradientu, jenž je nezbytný pro tvorbu naprosté většiny savčího ATP. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o struktuře a funkci jaderně kódovaných podjednotek enzymu, které jsou specifické pro jeho eukaryotní variantu. Podrobněji jsou diskutována kontroverzní témata týkající se podjednotky Cox4 a její regulační role v cytochrom *c* oxidáze. V práci jsou představeny i proteiny s COX volně asociované, které mohou modulovat aktivitu enzymu, ale častěji se podílí na jeho inkorporaci do respiračních superkomplexů. Na základě těchto poznatků je zde postulována tříúrovňová kvartérní struktura enzymu od katalytického jádra až po substechiometrické volně asociované proteiny, které dávají vznik různým variantám COX s odlišným podjednotkovým složením a rozdílně regulovanou funkcí.

**Klíčová slova:** mitochondrie, cytochrom *c* oxidáza, tkáňově specifické izoformy, Cox4, hypoxie, respirační superkomplexy

## Abstract

Cytochrome *c* oxidase (COX) is the terminal enzyme of the mitochondrial electron transport chain and its main function is transfer of electrons to the terminal acceptor, oxygen. Moreover, COX contributes to the generation of proton gradient, which is indispensable for the production of vast majority of ATP molecules in the mammalian cells. The present work summarizes available data concerning the structure and function of nuclear-encoded subunits, which are specific for the eukaryotic form of COX. Particular emphasis is put on the role of subunit Cox4 and its regulatory properties within the enzyme. The study also describes other proteins associated with the enzyme, which are able to regulate the activity of COX, but are mainly involved in formation and stabilization of the respiratory supercomplexes. Based on the summarized data, three levels model of quaternary COX structure is postulated. They correspond to subunits of the catalytic center, nuclear-encoded subunits and substoichiometrically associated proteins, which may give rise to several forms of COX with varying composition and differentially regulated function.

**Key words:** mitochondria, cytochrome *c* oxidase, tissue-specific subunits, Cox4, hypoxia, respiratory supercomplexes

# Obsah

<b>1. Úvod .....</b>	<b>1</b>
1.1 Struktura cytochrom <i>c</i> oxidázy .....	1
1.2 Katalytické jádro COX .....	3
1.3 Katalytická funkce COX.....	4
1.3.1 Elektronový přenos v COX.....	4
1.3.2 Katalytický cyklus v binukleárním centru .....	4
1.3.3 Pumpování protonů.....	5
1.3.4 Protonové kanály.....	6
1.4 Evoluce cytochrom <i>c</i> oxidázy.....	7
1.5 Asemblace cytochrom <i>c</i> oxidázy.....	9
1.5.1 <i>De novo</i> asemblace COX.....	9
1.5.2 Inkorporace jaderně kódovaných podjednotek do stávající COX .....	10
1.6 Superkomplexy .....	11
<b>2. Úloha jaderně kódovaných podjednotek COX .....</b>	<b>12</b>
2.1 Cox5a .....	12
2.2 Cox5b .....	12
2.3 Cox6a izoformy .....	13
2.4 Cox6b izoformy .....	14
2.5 Cox6c .....	15
2.6 Cox7a izoformy .....	15
2.7 Cox7b izoformy .....	15
2.8 Cox7c .....	16
2.9 Cox8 izoformy .....	16
<b>3. Podjednotka Cox4.....</b>	<b>17</b>
3.1 Alosterická regulace.....	17
3.2 Cox4 izoformy – genetické pozadí a struktura .....	18
3.3 Cox4 izoformy – exprese a funkce .....	19

3.4 Evoluce kyslíkové senzitivity .....	20
3.5 Cox4 izoformy – mechanismus regulace exprese v hypoxii.....	21
<b>4. Proteiny asociované s COX.....</b>	<b>24</b>
4.1 MNRR1 .....	24
4.2 NDUFA4.....	25
4.3 Rcf1 a Rcf2 (Respiratory Supercomplex Factor 1/2) .....	25
4.4 Higd1a a Higd2a (Hypoxia inducible domain family member 1A/2A).....	28
4.5 SCAFI (Supercomplex assembly factor I).....	29
4.6 Cox26 .....	31
<b>5. Závěr .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Reference .....</b>	<b>34</b>

## Seznam zkratek

AAC	ATP/ADP translokáza (ATP/ADP carrier)
ADP	adenosin difosfát
AOX	alternativní oxidáza
ATP	adenosin trifosfát
BAT	hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue)
Bcl-2	protiapoptotický protein poprvé identifikován v souvislosti s lymfomem B-buněk (B-cell lymphoma-2)
BNC	binukleární centrum
BN-PAGE	modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti Coomassie Brilliant Blue (Blue-native polyacrylamide gel electrophoresis)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CHCHD2	(coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain 2)
CMT	Charcot-Marie-Tooth syndrom
CN-PAGE	nativní polyakrylamidová elektroforéza (Clear-native polyacrylamide gel electrophoresis)
CoA	koenzym A
COX	cytochrom <i>c</i> oxidáza
CXXC5	CXXC finger protein 5
Cyt <i>c</i>	cytochrom <i>c</i>
DDM	dodecyl maltozid (n-dodecyl- $\beta$ -D-maltozid)
EMSA	analýza změn elektroforetické mobility
FAD	flavinadenin dinukleotid
FIH1	faktor inhibující HIF-1
HEK293	buněčná linie odvozená z lidských embryonálních buněk ledvin (Human embryonic kidney 293 cells)

HeLa	buněčná linie lidských epitelálních buněk
HIF-1	hypoxií indukovaný faktor 1
Higd1a/Higd2a	člen proteinové rodiny s hypoxií indukovanou doménou (Hypoxia inducible domain family member 1A/2A)
HPH1-3	HIF-1 prolyl hydroxyláza
HREs	elementy aktivované hypoxií (Hypoxia-response elements)
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (Inner mitochondrial membrane)
IMS	mezimembránový prostor (Inter membrane space)
KD	knockdown
KO	knockout
LSI komplex	intermediát pozdní fáze asemblace (Late-stage intermediate complex)
MALDI-MS	jemná ionizační technika používaná při hmotnostní spektrometrii (Matrix-assisted laser desorption/ionization - Mass spectrometry)
MEFs	myši embryonální fibroblasty ( <i>Mouse embryonic fibroblasts</i> )
MLS syndrom	mikroftalmie s lineárními kožními lézemi (Microphthalmia with linear skin lesions)
MNRR1	mitochondriální jaderný retrográdní regulátor 1 (Mitochondria nuclear retrograde regulator 1)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADH	nikotinamidadenin dinukleotid
NDUFA4	(NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4)
NSCLC	nemalobuněčný plicní karcinom
OE	navýšená exprese (overexpression)
ORE	element aktivovaný kyslíkem (oxygen responsive element)
OREFs	ORE vázající faktory (ORE-binding factors)
OXPHOS	oxidativní fosforylace



PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PKA	proteinkináza A
PLS	místo vstupu protonů (Proton loading site)
qPCR	kvantitativní PCR
Rcf	faktor ovlivňující tvorbu superkomplexů v respiračním řetězci (Respiratory supercomplex factor)
RBPJ	(Recombination signal sequence binding protein J <sub>κ</sub> )
RIRCD	reverzibilní infantilní deficiencie respiračního řetězce (Reversible infantile respiration chain deficiency)
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCAFI (Cox7RP,Cox7a2l)	asemblační faktor respiračních superkomplexů (Supercomplex assembly factor I, Cox7a-related protein)
SDS-PAGE	elektroforéza za denaturujících podmínek (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
shRNA	RNA vlásenka (Short hairpin RNA)
Sp1-like element	konsenzus sekvence promotorové oblasti genu vázající transkripční faktory
SNPs	jednonukleotidové polymorfismy (Single nucleotide polymorphisms)
T2	3,5-dijodtyronin (3,5-T <sub>2</sub> )
TIM	transportér přes vnitřní mitochondriální membránu (translocase of the inner membrane)
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl-p-fenylendiamin
TOM	transportér přes vnější mitochondriální membránu (translocase of the outer membrane)
Ucp1	rozpráhovací protein (uncoupling protein 1)
WT	divoký fenotyp (wild-type)

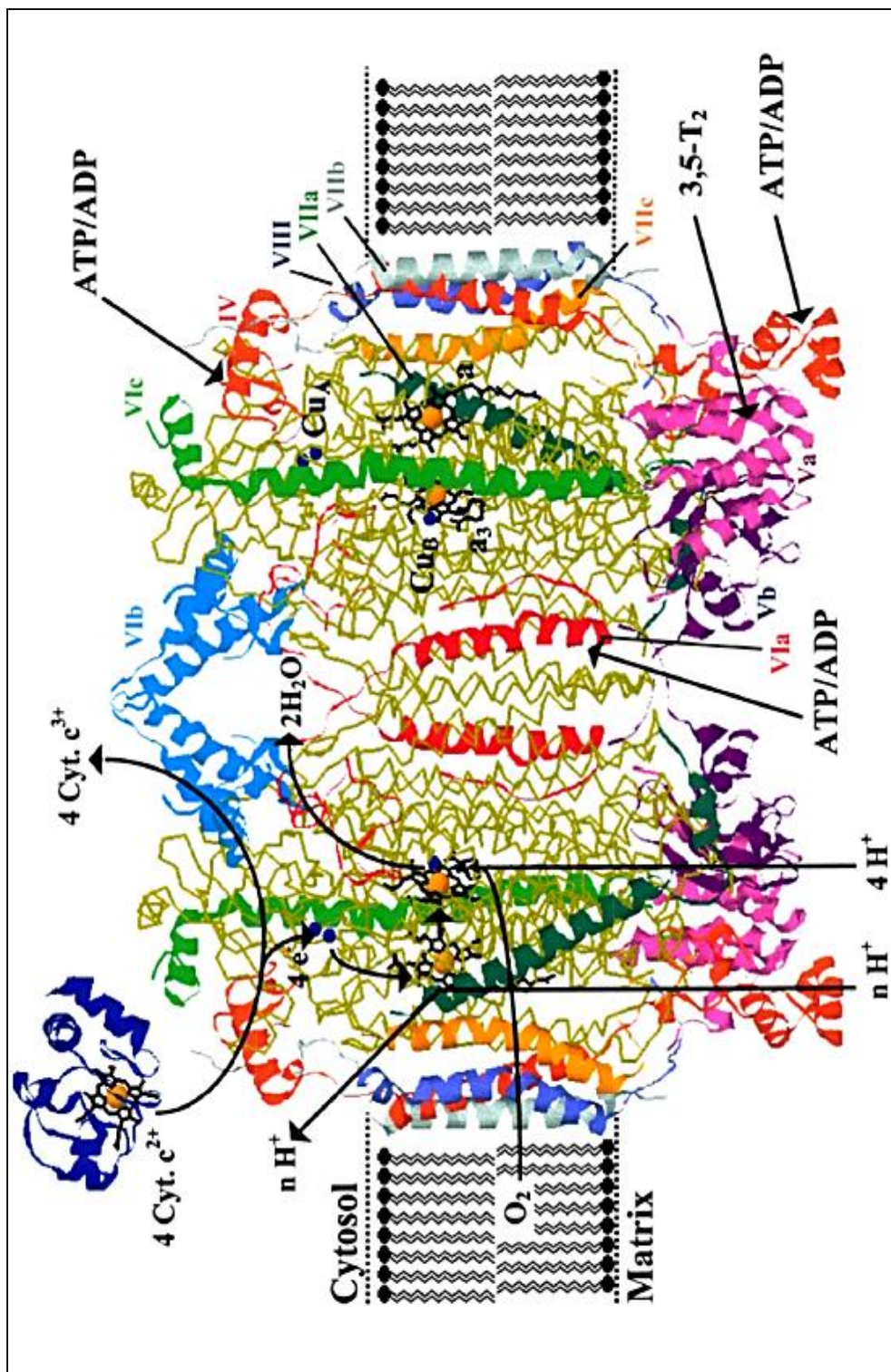
# 1. Úvod

Energie potřebná k životním pochodům eukaryotní buňky se převážně vytváří ve formě molekul ATP oxidativní fosforylací (OXPHOS). Tento proces je lokalizován v mitochondriích, které jsou centrální bioenergetickou organelou eukaryot. Na vnitřní mitochondriální membráně (IMM) jsou umístěny enzymy, které přenášejí elektrony na základě rostoucího redoxního potenciálu svých aktivních center až na terminální akceptor, jímž je kyslík. Tento proces je spřažen s pumpováním protonů přes IMM a dochází tak ke tvorbě protonového gradientu využitého ATP syntázou (komplex V) k syntéze ATP. Enzymy tvořící respirační řetězec jsou NADH-ubichinon oxidoreduktáza (komplex I), sukcinát-ubichinon oxidoreduktáza (komplex II), ubichinol-cytochrom *c* oxidoreduktáza (komplex III, cytochrom *bc<sub>L</sub>*) a cytochrom *c* oxidáza (komplex IV). Cytochrom *c* oxidáza (COX), která je členem rodiny hem-Cu oxidáz, je terminálním enzymem respiračního řetězce. Katalyzuje přenos elektronů na kyslík, který redukuje na vodu a také přispívá k vytváření protonového gradientu. Uplatňuje se též v regulaci celého elektron-transportního řetězce (Nicholls & Ferguson 2013).

## 1.1 Struktura cytochrom *c* oxidázy

Některé aerobní bakterie syntetizují jako terminální oxidázu cytochrom *aa3* typu, která je strukturně i funkčně homologní k mitochondriální COX. Oproti vícepodjednotkovým eukaryotním formám enzymu obsahuje enzym *Paracoccus denitrificans* pouze čtyři podjednotky (Iwata et al. 1995). Pro funkci nezbytné a dostačující podjednotky Cox1 a Cox2 jsou napříč organismy vysoce konzervovány, a to jak na úrovni jejich aminokyselinové sekvence, tak strukturně (Tsukihara et al. 1996; Iwata et al. 1995).

Monomer savčího enzymu se skládá ze 13 podjednotek, což bylo nejprve prokázáno pomocí SDS-PAGE s vysokým rozlišením (Kadenbach et al. 1983) a následně potvrzeno rentgenovou krystalografií bovinního srdečního dimeru COX (Tsukihara et al. 1996). Tyto podjednotky jsou kódovány jak jadernou, tak mitochondriální DNA. Mitochondriálně kódované podjednotky (Cox1, Cox2, Cox3) tvoří katalytické jádro enzymu a těsně vážou 10 jaderně kódovaných podjednotek (Cox4, Cox5a, Cox5b, Cox6a, Cox6b, Cox6c, Cox7a, Cox7b, Cox7c, Cox8) (Grossman, Lomax 1997). Nomenklatura podjednotek COX dle Kadenbacha a jeho skupiny je obecně uznávána a je stanovena dle klesající molekulární hmotnosti podjednotek, která byla pozorována na SDS-PAGE, přičemž podjednotky podobné molekulové hmotnosti, jež byly detekovány ve společném proužku, jsou rozlišeny písmenem (Kadenbach, Merle, 1981).



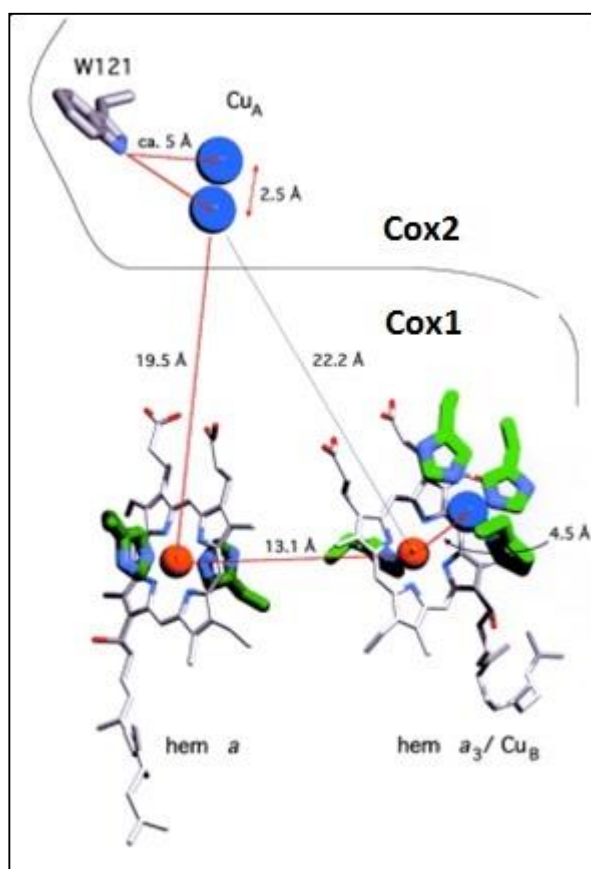
**Obrázek 1: Krystalová struktura dimeru bovinní srdeční COX (Kadenbach & Hüttemann 2015)**

Mitochondriálně kódované podjednotky jsou ve žluté barvě. Jaderně kódované podjednotky jsou barevné.

Jsou zde vyobrazeny i reakční centra enzymu a základní procesy s enzymem spojené.

## 1.2 Katalytické jádro COX

Katalytické jádro savčího enzymu (viz obr. 2) je tvořeno třemi podjednotkami (Cox1, Cox2 a Cox3). Podjednotka Cox1 sestává ze 12 transmembránových  $\alpha$ -helixů a obsahuje tři katalytická centra enzymu COX. Jsou jimi hem  $a$  a binukleární centrum (BNC) složené z hemu  $a_3$  a  $\text{Cu}_B$  atomu. Hem  $a$  je hem s nízkým spinem koordinovaný šesti vazbami a je umístěn ve třetině membrány od mezimembránové strany. Cox2 podjednotka je složena ze dvou transmembránových helixů. Hydrofilní doména na cytosolické straně vytváří vazebné místo pro cytochrom  $c$  a obsahuje bimetalické  $\text{Cu}_A$  katalytické centrum tvořené dvěma atomy mědi ( $\text{Cu}^I/\text{Cu}^{II}$ ), které je primárním akceptorem elektronů. Cox3 tvoří sedm transmembránových helixů a neobsahuje žádnou prostetickou skupinu. Slouží ke stabilizaci katalytického centra enzymu tvořeného podjednotkami Cox1 a Cox2 (Kaila et al. 2010; Nicholls & Ferguson 2013). Pokud dojde k její ztrátě, snižuje se stechiometrie přepumpovaných protonů jak v bakteriálním tak mitochondriálním enzymu. Ztráta také zvyšuje pravděpodobnost sebevražedné inaktivace, kdy z BNC zmizí  $\text{Cu}_B$ , redox potenciál hemu  $a_3$  se sníží a přenos elektronů mezi hemy je tak inaktivován (Bratton et al. 1999).



**Obrázek 2: Katalytické centrum COX (upraveno z Ludwig et al. 2001)**

Na obrázku jsou zobrazena katalytická centra podjednotek Cox1 a Cox2. Modré koule představují atomy mědi a červené koule atomy železa.

## 1.3 Katalytická funkce COX

COX katalyzuje přenos elektronů přijatých z cytochromu *c* na kyslík. S tímto procesem je spřažena translokace protonů přes IMM, která generuje transmembránový elektrochemický protonový gradient, neboli protonmotivní sílu, využívanou ATP syntázou. Na každý elektron přenesený na kyslík jsou přes membránu translokovány ekvivalenty dvou kladných nábojů. Prvním je “chemický” proton, přenášený do aktivního centra z mitochondriální matrix, který kompenzuje náboj elektronu přiváděného z mezimembránového prostoru a podílí se na redukci kyslíku. Elektron-protonové spřažení je přímé. Druhý, “fyzikální” proton, je pumpován z matrix do mezimembránového prostoru (IMS) a nepodílí se na samotné chemické reakci, ačkoli je jeho pohyb s ní nepřímo spřažený. Zdá se, že elektron-proton spřažený přenos je sekvenčním procesem (shrnuje Kaila et al. 2010).

Přenos elektronů (tzv. tunneling) skrze kovová centra COX má za následek vytvoření silného elektrického pole v proteinu, které zajišťuje směřování pohybu protonů. Dochází k polarizování molekul vody do dipóly tvořících řetězců směrem od protonového donoru k akceptoru. Vzniká tak výhodná cesta pro přenos protonů. Tento polarizovaný řetězec vody snižuje bariéru pro iniciační přenos protonu z donoru na první molekulu vody v řetězci. Po přeskočení protonu na akceptor je polarita vody obrácena (shrnuje Kaila et al. 2010).

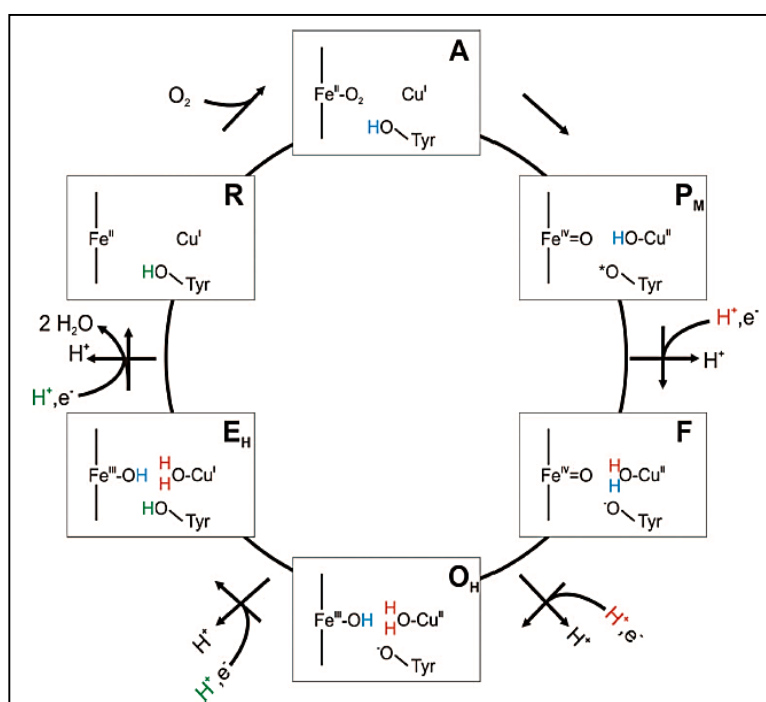
### 1.3.1 Elektronový přenos v COX

COX přijímá elektrony z redukovaného cytochromu *c* na mezimembránové straně COX. K dokování dochází díky elektrostatickým silám, tedy interakcí konzervovaných lyzinů cytochromu *c* s karboxylovými skupinami na hydrofilní části Cox2 podjednotky (Millett et al. 1983). Vstupním místem pro elektrony je Cu<sub>A</sub> centrum, odkud jsou po jednom transportovány na hem *a*. Hem *a* je důležitým místem, které bylo nazváno “electron-queuing site“, neboť další přenos na BNC je již závislý na protonech (Babcock & Wikstrom 1992). U mutovaných oxidáz byl pozorován i přímý přenos elektronů z Cu<sub>A</sub> centra na hem *a*<sub>3</sub> (byl tedy vynechán hem *a*), ale výrazně se snížila účinnost enzymu (Kannt et al. 1999). Z hemu *a* putují elektrony na BNC (hem *a*<sub>3</sub> a Cu<sub>B</sub>). Vzdálenost mezi hemy je v rámci nadrodiny hem-Cu oxidáz plně konzervována (7 Å) (shrnuje Kaila et al. 2010).

### 1.3.2 Katalytický cyklus v binukleárním centru

Kyslík difunduje do aktivního centra COX z membránového prostoru nepolárním kanálem, který byl pozorován na krystalové struktuře enzymu (Tsukihara et al. 1996). Váže se do BNC za vzniku hem-kyslíkového aduktu (Chance et al. 1975). Po vazbě do COX se kyslíková vazba

okamžitě štěpí. Pro redukci kyslíku poskytne jeden elektron tyrozinový zbytek (Tyr280), který vytvoří neutrální radikál. Druhý elektron pochází z  $\text{Cu}_B$  a zbylé dva elektrony ze železnatého kationtu hemu  $a_3$ . Přenos těchto čtyř elektronů probíhá současně, aby nedocházelo k vytváření reaktivních forem kyslíku (ROS) (Ludwig et al. 2001). Původní oxidační stav BNC je regenerován ve čtyřech redukčních krocích, při kterých jsou vždy jeden elektron z hemu  $a$  a jeden proton z matrix (“chemický”) přivedeny do BNC, zatímco další jeden proton (“fyzikální”) je přepumpován do IMM. Mechanismus pumpování se zdá být stejný ve všech čtyřech reakcích (shrnuje Kaila et al. 2010). Podrobné schéma cyklu včetně oxidačního stavu aktivních komponent BNC je na obr. 3.



**Obrázek 3: Katalytický cyklus BNC (Kaila et al. 2010)**

Schéma vyobrazuje postupné redukční kroky v BNC a jeho jednotlivé stavy.

### 1.3.3 Pumpování protonů

Studium mechanismu protonového pumpování COX je již po několik dekád jedním z nejdiskutovanějších témat bionergetiky. Současné poznatky jsou výsledkem biofyzikálních experimentů na dvou modelech – savčí COX izolované z bovinního myokardu a jednodušší prokaryotické variantě enzymu z *P. denitrificans*, kde jsou generovány i nespočetné mutantní varianty.

Dnes nejpřijímanější mechanismus předpokládá místo vstupu protonů, tzv. “proton loading site“ (PLS), v propionátové doméně hemu  $a_3$ , které přijímá proton z matrix díky D kanálu v momentě, kdy je hem  $a$  obsazen elektronem. Tento proton v PLS zvyšuje redox potenciál BNC, což umožní elektronu přesun z hemu  $a$  do BNC. Ten poté přitáhne “chemický“ proton z matrix do BNC, což má za následek elektrostatickou repulzi protonu z PLS do IMS. Molekulárně dynamické simulace tomuto mechanismu elektrostatického pumpování nasvědčují, dokonce byla pozorována tvorba molekul vody mezi Glu242 a hemem  $a_3$  za situace, kdy byl hem  $a$  redukován a BNC oxidováno (před transportem elektronu do BNC) (Fadda et al. 2008).

Alternativní návrh na mechanismus pumpování protonů zahrnuje nejprve přenos “chemického“ protonu do BNC, což má vést ke změně konformace umožňující přechod “fyzikálního“ protonu do PLS (Brzezinski & Larsson 2003).

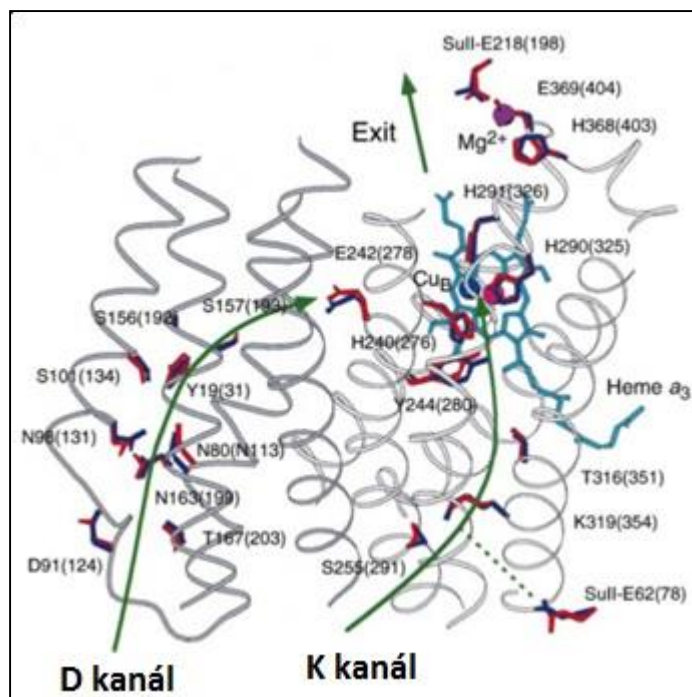
### 1.3.4 Protonové kanály

Na základě místně-specifické mutageneze (Hosler et al. 1993) a krystalové struktury (Tsukihara et al. 1996) se předpokládá existence dvou, případně tří, protonových kanálů umístěných v podjednotce Cox1 (viz obr. 4).

D kanál, dle kyseliny asparagové (Asp91 bovinního enzymu), u tohoto zbytku začíná a končí v blízkosti BNC kyselinou glutamovou (Glu242 bovinní COX), podle níž se mu alternativně říká E kanál. Za Glu242 je apolární kavita, která může být plněna vodou vznikající jako produkt reakce v BNC (Wikström et al. 2003). Samotný D kanál obsahuje několik molekul vody a polární aminokyseliny. Kanál je v místě aminokyselinového zbytku Asn98 přerušen a pro průchod protonů je zapotřebí izomerizace tohoto zbytku (Henry et al. 2009). Hlavním aminokyselinovým zbytkem K kanálu je lysin (Lys319 bovinního enzymu). K kanál vede k tyrozinu (Tyr280) BNC. K kanál, podobně jako D kanál, obsahuje molekuly vody a rovněž u něj nebyl pozorován nepřetržitý přenos protonů (Kaila et al. 2010).

Předpokládá se, že K kanálem prochází první či první dva protony do reakčního centra, kde jsou spotřebovány k tvorbě vody (transportují tedy “chemické protony“), zatímco zbylé protony, jak chemické tak pumpované, jsou translokovány skrze D kanál (Konstantinov et al. 1997; Vygodina et al. 1997). Recentní studie je v souladu s touto tezí a dle ní se K kanál využívá k transportu prvního protonu během redukce BNC prvními elektrony (Ruitenberget al. 2000).





**Obrázek 4: D a K protonové kanály COX (upraveno z Abramson et al. 2001)**

Existence třetího, “H” kanálu, je kontroverzním tématem. Byl predikován na základě krystalové struktury bovinního srdečního enzymu (Yoshikawa et al. 1998; Tsukihara et al. 1996). Dokonce byla formulována hypotéza, že by jeho prostřednictvím fosforylací regulovaný enzym mohl za nízkého membránového potenciálu zvyšovat stechiometrii přepumpovaných protonů (Kadenbach et al. 2013). Avšak studie s bakteriální COX s mutacemi aminokyselinových zbytků v jeho navržené struktuře nevykázaly podstatné funkční fenotypy a jeho existenci tak nenasvědčují (Pfützner et al. 1998; Lee et al. 2000; Salje et al. 2005).

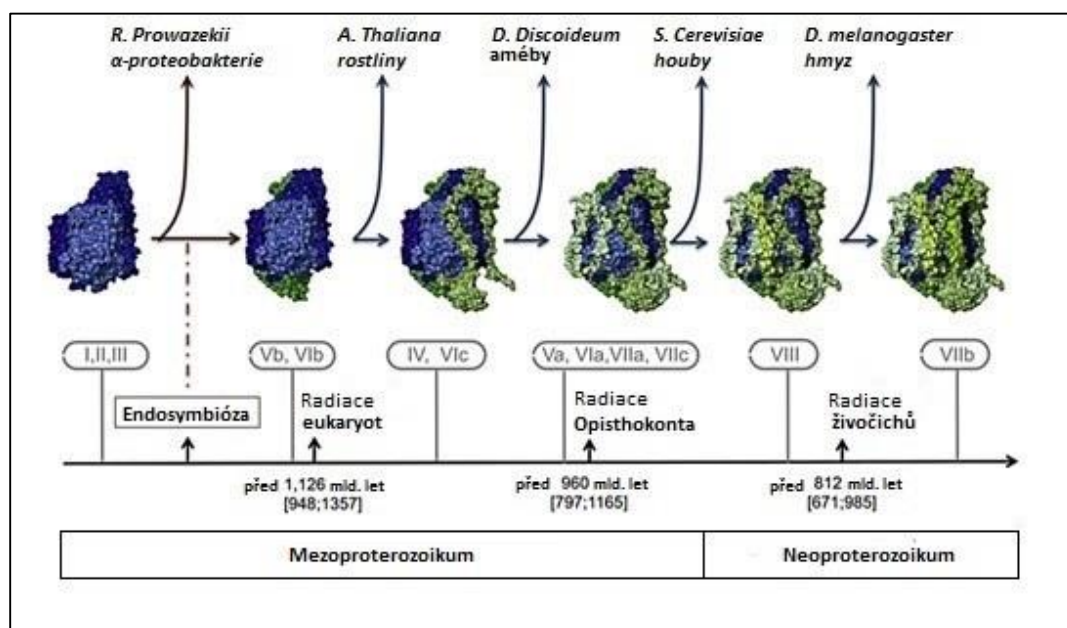
## 1.4 Evoluce cytochrom *c* oxidázy

Po objevu jaderně kódovaných COX podjednotek vyvstala otázka, jestli mají paralogy u prokaryotických organismů, anebo představují eukaryotní evoluční novinku. Ačkoli u mnoha genů pocházejících z předchůdce mitochondrií došlo po endosymbióze k přesunutí z mitochondriálního do jaderného genomu, v tomto případě tomu tak nejspíš není a podjednotky nemají původ v mitochondriálním genomu (Szklarczyk & Huynen 2010). Nepodařilo se totiž nalézt homology těchto genů v genomu *Rickettsia prowazekii*, současného nejpodobnějšího taxonu předpokládaného endosymbionta, (Das et al. 2004; Andersson et al. 1998), ani v genomu *Reclinomonas americana*, kde se zachovává největší počet mitochondriálních genů (Lang et al. 1997).



Při pátrání po homologních jaderně kódovaných podjednotkách u *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že alespoň některé z těchto podjednotek se vyskytují téměř u všech eukaryotních organismů, musely tedy vzniknout před rozdělením na hlavní eukaryotní linie (Das et al. 2004). Největší komplexity dosáhla COX u mnohobuněčných živočichů. V některých taxonech, například u jednobuněčných parazitů, se určité podjednotky nevyskytují nejspíš kvůli sekundární ztrátě nebo proto, že vznikly později (Pierron et al. 2012).

COX je, spolu s cytochromem *c*, mitochondriální entitou, která vykazuje tkáňově specifickou expresi svých několika podjednotek, čímž je umožněna regulace produkce ATP v různých tkáních dle jejich požadavků (Hüttemann, Helling, et al. 2012). Savčí enzym disponuje pěti takovými podjednotkami – Cox4, Cox6a, Cox6b, Cox7a a Cox8. Tkáňově specifické podjednotky pravděpodobně vznikly duplikací genu původní podjednotky a jde tedy o paralogy (Little et al. 2010). Jednou z možností je vznik duplikací jednotlivých podjednotek odděleně, čemuž nasvědčuje nízká konzervovanost paralogů. Alternativní cestou jejich vzniku je celogenomová duplikace, která proběhla dvakrát (Blomme et al. 2006). Tuto variantu podporují podjednotky se dvěma paralogy v rámci ryb i tetrapodů (Cox4, Cox6a, Cox7a). Oproti tomu podjednotka Cox6b vykazuje dvě izoformy v rámci ryb a většině tetrapod, přičemž linie primátů má tyto izoformy tři (Little et al. 2010). Po duplikaci mohlo dojít selekčním tlakem ke vzniku speciálních funkcí jednotlivých podjednotek a tím i ke tkáňově specifické expresi jednotlivých izoform (shrnuje Pierron et al. 2012).



**Obrázek 5: Schéma hypotetického vývoje COX u eukaryot (upraveno z Pierron et al. 2012)**

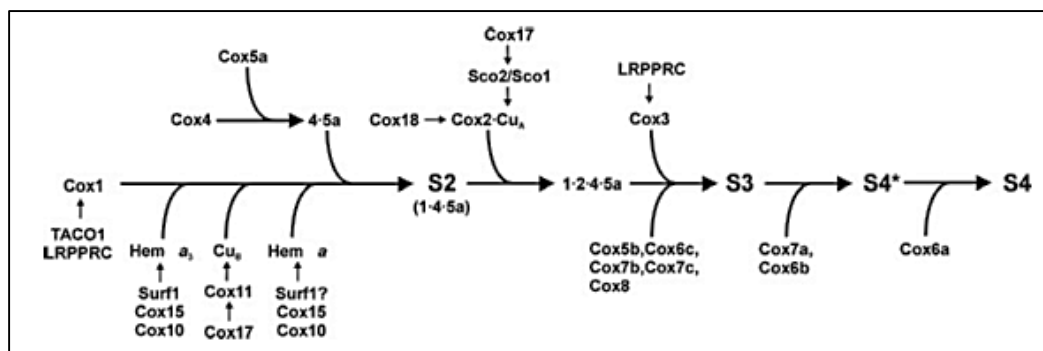
Mitochondriálně kódované podjednotky jsou zvýrazněné modře, jaderně kódované podjednotky zeleně.

## 1.5 Asemblace cytochrom *c* oxidázy

Správné složení enzymu je zásadní pro jeho efektivní fungování. Jelikož je COX kódována dvěma různými geny, je zapotřebí koordinovaná jak exprese jednotlivých strukturních podjednotek, tak i jejich posttranslační úprava v cytosolu a v mitochondriích. Uplatňuje se zde tedy komunikace (signalizace) mezi jádrem a mitochondriemi. Jelikož jsou pro funkci nezbytné i mnohé kofaktory, je důležitá i jejich homeostáza a inkorporace do apoenzymu (popisuje Fontanesi et al. 2006). Studie prováděné na respiračně deficientních mutantech *Saccharomyces cerevisiae* odhalily, že je zapotřebí mnoho desítek jaderně kódovaných faktorů uplatňujících se ve všech fázích sestavování COX (McEwen et al. 1986; Tzagoloff & Dieckmann 1990). Ovlivňují mitochondriální transkripci, úpravu mitochondriální mRNA, mitochondriální translaci, vkládání podjednotek do membrány, homeostázi Cu iontů a jejich inkorporaci do apoenzymu, biosyntézu hemů a jejich vložení do enzymu (Khalimonchuk & Rödel 2005; Fontanesi et al. 2006). Většina těchto asemblačních faktorů byla postupně nalezena i u vyšších eukaryot. Proces asemblace COX je mezi kvasinkami a člověkem konzervován. Mutace těchto genů (např. SURF1, SCO2) jsou dokonce nejčastější příčinou vrozených defektů COX (Pecina et al. 2004).

### 1.5.1 *De novo* asemblace COX

Při studiu lidského enzymu se pomocí nativní polyakrylamidové gelové elektroforézy (BN-PAGE) podařilo pozorovat intermediáty, které naznačují postupné skládání enzymu (viz obr. 6). Navíc jednotlivé subkomplexy odpovídají tomu, že se při sestavování enzymu uplatňují rychlost omezující procesy a tudíž je biosyntéza tohoto enzymu regulovaná (Nijtmans et al. 1998). Proces složení enzymu začíná biogenezí Cox1 podjednotky, která je prvním intermediátem. Druhý intermediát vzniká po přidání podjednotek Cox4 a pravděpodobně i Cox5a (Williams et al. 2004; Nijtmans et al. 1998). Třetí intermediát navíc obsahuje podjednotky Cox2, Cox3, Cox5b, Cox6c, Cox7b, Cox7c a Cox8 (Nijtmans et al. 1998; Williams et al. 2004; Fornuskova et al. 2010). Přidáním podjednotek Cox7a a Cox6b vzniká poslední asemblační intermediát. Tvorba holoenzymu je poté dokončena připojením podjednotky Cox6a (Fornuskova et al. 2010). Studie na buňkách s shRNA-utišenou expresí jaderně kódovaných podjednotek potvrdily předchozí výsledky, že pro skládání funkčního COX enzymu jsou zcela nezbytné Cox4 a Cox5a podjednotky, přičemž pro stabilitu holoenzymu je důležitá Cox6a (Fornuskova et al. 2010).



**Obrázek 6: Model de-novo assemblerie savčí COX (upraveno z Fornuskova et al. 2010)**

S2, S3 a S4\* představují jednotlivé intermediáty assemblerie. S4 je holoenzym COX. Jsou zde zobrazeny jednotlivé podjednotky s kofaktory a assembleriačními faktory zajišťujícími jejich úpravu a inkorporaci.

### 1.5.2 Inkorporace jaderně kódovaných podjednotek do stávající COX

Kromě de-novo assemblerie byla u ostatních komplexů elektron-transportního řetězce objevena možná přímá inkorporace jednotlivých podjednotek importovaných do mitochondrií do již sestaveného holoenzymu. Podobná inkorporace podjednotek byla nalezena i v případě COX. Výsledky studie založené na elektroforetickém „stopování“ radioaktivně značených podjednotek připravených pomocí *in vitro* translace a následně importovaných do izolovaných mitochondrií ukazují, že podjednotky, které jsou při *de novo* skládání enzymu přidávány v posledních fázích, mají lepší předpoklady pro přímou inkorporaci do holoenzymu (Lazarou et al. 2009).

Konkrétně se tohoto procesu účastní podjednotky Cox6a, Cox6b a Cox7a, jež mohou být přímo zabudovány jak do monomerního enzymu, tak do COX inkorporované do superkomplexů (Lazarou et al. 2009). Byla zjištěna existence evolučně konzervovaného intermediátu pozdní fáze assemblerie (LSI komplex), ve kterém se shlukují Cox6a a Cox7a podjednotky s potřebnými faktory před inkorporací do COX holoenzymu či rovnou do superkomplexů enzymů dýchacího řetězce. Případně by LSI komplex mohl být vkládán do maturující COX (Lazarou et al. 2009). U podjednotek Cox4-1 a Cox6c k přímé inkorporaci do monomerní COX ani do superkomplexů kontrolních mitochondrií nedochází, avšak tvoří vysokomolekulární komplexy, které mohou představovat intermediáty jejich maturace v přítomnosti dalších faktorů (Lazarou et al. 2009). Překvapivě byly veškeré zmíněné podjednotky (Cox4-1, Cox6a, Cox6b, Cox6c a Cox7a) schopny inkorporace do I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> superkomplexu mitochondrií pacientů s assembleriačními defekty COX. Autoři si to vysvětlují tím, že v patientských mitochondriích se nově importované podjednotky spíše dostanou do

intermediátů pro vložení do COX, neboť nemusí kompetovat s preexistujícími podjednotkami, jejichž hladina je snížena (Lazarou et al. 2009).

Můžeme dále hypotetizovat, že výše popsany mechanismus by se mohl uplatňovat i při výměně tkáňově specifických izoform jaderně kódovaných podjednotek COX. Efektivnější inkorporace jedné z páru izoform by mohla představovat mechanismus nastavení správného podjednotkového složení.

## 1.6 Superkomplexy

COX se kromě vytváření dimerů účastní tvorby superkomplexů (respirasomů), které jsou tvořeny komplexy elektron-transportního řetězce. Toto sdružování do superkomplexů pravděpodobně ovlivňuje efektivitu, s jakou probíhá přenos elektronů mezi jednotlivými komponentami. Dva modely popisují možné uspořádání respiračního řetězce. První, „solid-state“ model, předpokládá, že superkomplexy fungují jako jeden celek a substrát je v něm přesouván formou preferenčního toku (tzv. channelingu) z jednoho komplexu na druhý (Chance & Williams 1955). Tento model byl dlouhou dobu zavrhován, neboť byly z mitochondrií izolovány jednotlivé plně funkční enzymatické komponenty (Hatefi et al. 1962). Druhý model popisuje přenos elektronů jako výsledek náhodných srážek jednotlivých komplexů a přenašečů volně se pohybujících v IMM (Chazotte & Hackenbrock 1989). Avšak nacházené superkomplexy preferenčně tvořené určitými enzymy naznačují koexistenci obou modelů a tímto způsobem je uspořádávání superkomplexů dnes chápáno (model plasticity) (Bianchi et al. 2004).

Nejhojnějším superkomplexe, jehož je COX součástí v bovinním srdci, je  $I_1III_2IV_n$  (index udává, v jaké četnosti se komplex v superkomplexu vyskytuje,  $n = 1$  až 4) (Schägger & Pfeiffer 2000). Existence superkomplexů byla potvrzena pomocí metod 1-D/2-D BN-PAGE a 1-D CN-PAGE (Wittig & Schägger 2005). 3-D struktura byla objasněna metodou MALDI-MS a snímky superkomplexů  $I_1III_2IV_1$  vytvořenými kryo-elektronovou mikroskopií (Schäfer et al. 2006). Důležitou roli při stavbě superkomplexů hraje kardiolipin, glycerolfosfolipid vnitřní mitochondriální membrány, který stabilizuje jak samotný komplex COX, tak celý superkomplex (Pfeiffer et al. 2003).

## 2. Úloha jaderně kódovaných podjednotek COX

Eukaryotní enzym má oproti bakteriálnímu větší množství podjednotek, jak již bylo zmíněno výše. Jaderně kódované podjednotky jsou tak jakousi luxusní nadstavbou, která není pro základní funkci esenciální, ale umožňuje ji za určitých podmínek ovlivňovat. Několik podjednotek dokonce vykazuje tkáňově a vývojově specifické izoformy, které mohou regulovat činnost enzymu “na míru” v různých tkáních. Tyto izoformy jsou kódovány separátními geny.

### 2.1 Cox5a

Cox5a je v COX lokalizovaná na její matrixové straně a sestává z pěti  $\alpha$ -helixů, které dohromady vytváří pravotočivý superhelix (Tsukihara et al. 1996). U bovinního srdečního enzymu byla prokázána specifická vazba 3,5-dijodtyroninu (T2, prekurzor thyroidních hormonů), která má za následek znemožnění alosterické ATP-inhibice COX a tím stimuluje energetický metabolismus buňky (Lanni et al. 1996; Cimmino et al. 1996). Nadměrná exprese Cox5a u buněk nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC) silně korelovala s lepší migrací a tedy i invazivitou nádorových buněk a je tudíž navrhována jako biomarker agresivity NSCLC. Knockdown COX5a invazivitu nádorových buněk snižoval (W.-L. Chen et al. 2012). Jiné studie ukázaly, že zvýšená akumulace COX5a v mitochondriích je dosahována díky interakci s anti-apoptotickým proteinem Bcl-2. Nadměrná exprese Bcl-2 zvyšuje množství podjednotky lokalizované do mitochondrií, aniž by Bcl-2 měnil expresi COX5a. Byla formulována hypotéza, že interakce těchto dvou proteinů zvyšuje mitochondriální aktivitu a vede i k mírnému zvýšení oxidačního stresu, který má pozitivní vliv na viabilitu a proliferaci nádorových buněk (Chen & Pervaiz 2010).

### 2.2 Cox5b

Cox5b je matrixovou podjednotkou COX a na její C-terminální části se vytváří  $\beta$ -barelová struktura s motivem zinkového prstu (Tsukihara et al. 1996). Savčí podjednotka má pouze jednu izoformu, ale u pstruha duhového byly objeveny dvě izoformy lišící se N-koncovou sekvencí. Obě izoformy byly detekovány jak v srdeční tak jaterní tkáni, ačkoli v odlišných poměrech (Freund & Kadenbach 1994). Knockdown této podjednotky u myší makrofágové linie RAW 264.7 měl za následek snížení aktivity COX a membránového potenciálu a zvýšenou produkci ROS. Dvourozměrná BN/SDS i pulse-chase analýza značených produktů translace mitochondriálně kódovaných proteinů ukázaly akumulaci COX asemblačních intermediátů S1 a S2. Tyto poznatky nasvědčují možné roli této podjednotky při asemblaci COX (Galati et al. 2009). Imunoprecipitací byla pozorována interakce Cox5a s regulační podjednotkou

cAMP-dependentní protein kinázy A, jež inhibuje aktivitu COX (Yang et al. 1998). U nádorových buněčných linií byl pozorován zvýšený poměr jaderně kódovaných podjednotek vzhledem k mitochondriálně kódovaným, zvláště podjednotky Cox5b vůči Cox1, podobně jako je to v nádorových buňkách se zvýšenou expresí podjednotky Cox5a (W.-L. Chen et al. 2012; Krieg et al. 2004; Chen & Pervaiz 2010).

## 2.3 Cox6a izoformy

Podjednotka Cox6a je svým transmembránovým helixem v kontaktu s podjednotkou Cox3. Deset aminokyselinových zbytků N-konce v membránové části je v kontaktu s helixy Cox1 podjednotky druhého monomeru COX v dimeru a tím jej nejspíš stabilizuje. Savčí Cox6a existuje ve dvou izoformách, Cox6a-L a Cox6a-H. Jejich odlišnost byla zjištěna sekvenací N-terminální aminokyselinové sekvence Cox6a podjednotky z jater a srdce savců (Linder et al. 1995). Cox6a-L (liver) je exprimovaná ve všech tkáních, zatímco Cox6a-H (heart) je exprimována pouze v srdeční tkáni a kosterním svalstvu. Nástup exprese srdeční izoformy je vývojově regulován. Northern analýza adultní a fetální bovinní tkáně poukázala na obsah Cox6a-L transkriptů (ačkoli 4x menší než obsah Cox6a-H transkriptů) ve fetálním srdci a kosterním svalstvu, zatímco adultní tkáň obsahovala pouze Cox6a-H transkripty (Ewart et al. 1991). Studie vývojově-specifické exprese u člověka poukázala na nárůst množství transkriptů Cox6a-H v srdci a kosterní svalovině u dospělého oproti novorozenci (Bonne et al. 1993). Recentní studie probíhaly i na myoblastových buněčných kulturách z biopsií pacientů s reverzibilní infantilní deficiencí respiračního řetězce (RIRCD), která odhalila, že ke změně exprese tkáňově specifických izoform (Cox6a i Cox7a) dochází okolo 3. měsíce po narození (Boczonadi et al. 2015).

Izoforma Cox6a-L, v rekonstituované COX izolované z bovinních ledvin, po přidání volného palmitátu snižuje schopnost pumpování protonů, zatímco jiné mastné kyseliny (kyselina laurová, kyselina myristová, kyselina stearová, kyselina olejová) ani palmitoyl-CoA na ni tento účinek nemají. Tento jev není u srdeční izoformy pozorován. Předpokládá se, že jde o stimulaci termogeneze volným palmitátem ve tkáních vyjma svalů (Lee & Kadenbach 2001). V genu COX6A1 byla objevena mutace (delece 5bp, 247-10\_247-6del CACTC) u pacientů s axonální formou Charcot-Marie-Tooth syndromu (CMT). Mutace vedla ke snížené expresi Cox6a-L

a COX aktivitě (Tamiya et al. 2014). Fenotyp peroneální svalové atrofie byl reprodukován na myším modelu COX6a1 delece (Cox6a-H-KO). Mutace v genu pro jaterní izoformu COX6a se tak řadí mezi několik desítek genů asociovaných s patologií CMT. V rámci studie bohužel

nebyly provedeny nativní elektroforézy pro objasnění vlivu deficiencie podjednotky Cox6a na asemblaci enzymu.

Cox6a-H disponuje vazebným místem pro ADP na jejím N-konci orientovaném k matrix. Výsledkem pokusů s rekonstituovanou COX z bovinního srdce byla stimulace její aktivity alosterickou regulací pomocí ADP (Anthony et al. 1993). Podobný pokus s vysokou intraliposomální koncentrací ATP odhalil výrazné snížení hodnoty P/O kvocientu, které bylo přímo připisováno snížené stechiometrii přepumpovaných protonů na 1 elektron (Kadenbach et al. 1995; Frank & Kadenbach 1996). Předpokládaná fyziologická funkce této regulace je stimulace termogeneze ve svalové tkáni při odpočinku a spánku. Model Cox6a-H deficientní myši vykazoval sníženou COX aktivitu v srdečním svalu, korelující se sníženým obsahem COX holoenzymu. Nepřítomnost COX6a-H tedy způsobuje poruchu asemblace či zhoršenou stabilitu COX (Radford et al. 2002).

## 2.4 Cox6b izoformy

Periferní podjednotka Cox6b-1, která je lokalizována na mezimembránové straně enzymu, obsahuje dva cysteinové můstky (mezi Cys29 a Cys64, Cys39 a Cys53). Oblast mezi Cys39 a Cys53 dvou monomerů zprostředkovává jejich těsný kontakt a stabilizuje dimer COX (Tsukihara et al. 1996). Pokud je Cox6b-1 odstraněna z enzymu pomocí mírné solubilizace, zdvojnásobí se enzymatická aktivita COX beze změny stechiometrie translokace protonů (Weishaupt & Kadenbach 1992). Předpokládá se, že dojde k monomerizaci enzymu, kdy má cytochrom *c* lepší přístup k enzymu. Ve formě dimeru se naopak ustavuje kooperativita monomerů v kinetice vazby cytochromu *c* (Kadenbach & Hüttemann 2015). V genu pro Cox6b-1 byly popsány mutace, které mají patologické následky. Jako první byla u dvou dětských pacientů popsána encefalomyopatie zapříčiněná substituční mutací (221G/A) v exonu 2, která má za následek aminokyselinovou záměnu (Arg19His) (Massa et al. 2008). V kultivovaných fibroblastech pacientů byla pozorována snížená schopnost inkorporace mutované podjednotky do enzymu. Jeho stabilita tím byla snížena, jak ukázaly nálezy rychleji migrujících COX komplexů v nativních gelech. Aktivita takto modifikovaného enzymu byla výrazně snížena. Nedávno byla objevena druhá záměnná mutace (Arg20Cys) COX6B1 genu, která je příčinou encefalomyopatie, hydrocefalu a hypertrofické kardiomyopatie (Abdulhag et al. 2015). I tato mutace byla spojena se sníženým obsahem podjednotky a nižší COX aktivitou.

Savčí Cox6b má tkáňově specifickou podjednotku Cox6b-2, která je exprimována výhradně ve varlatech. Vzhledem k interakci cytochromu *c* s Cox6b při dokování cytochromu *c* u podjednotky Cox2 by přítomnost testikulární izoformy Cox6b mohla být známkou koevoluce

s testikulární formou cytochromu *c* (Hüttemann, Jaradat, et al. 2003). Ta ale na rozdíl od Cox6b-2 není zachována ve všech savčích liniích včetně primátů. Oproti Cox6b-1 obsahuje dva tyrozinové zbytky, které mohou být potenciálně fosforylovány. Hypoteticky by mohly být jedním z mnoha cílů globální cAMP-dependentní tyrozinové fosforylace nezbytné k aktivaci motility spermií (Krzyzosiak et al. 2000).

## 2.5 Cox6c

Cox6c je podjednotka tvořená transmembránovým helixem, který je v kontaktu s Cox1 a Cox2 podjednotkami (Tsukihara et al. 1996). Ačkoli je v blízkosti katalytického centra enzymu, zatím nebyla zjištěna žádná specifická funkce.

## 2.6 Cox7a izoformy

Stejně jako podjednotka Cox6a, i Cox7a má 2 izoformy (H a L), které vykazují stejnou tkáňově i vývojově specifickou expresi (Bonne et al. 1993). Bylo pozorováno zvýšení hladiny mRNA pro Cox7a-H izoformu v adultní kosterní svalovině oproti fetální tkáni. Delece genu pro Cox7a-H u myši měla za následek dilatační kardiomyopatii a došlo ke snížení aktivity COX, ačkoli v srdeční tkáni myši s delecí Cox7a-H (Cox7a-H-KO) došlo ke kompenzaci ztráty srdeční izoformy zvýšeným množstvím hladiny Cox-7aL a její inkorporací do holoenzymu. Tento jev se zdá být specifický pro podjednotku Cox7a, u Cox6a-H-KO modelu nebyla tato kompenzace pozorována (Hüttemann, Klewer, et al. 2012). Neočekávaná exprese Cox7a-H podjednotky byla nalezena v hladké svalovině bovinního bachoru, kde ostatní tkáňově specifické podjednotky vykazují L-izoformy (Cox6a-L, Cox8-L) (Anthony et al. 1990).

Zajímavostí je nedávno objevená možná regulace genové exprese Cox7a-H (Cox7a1) izoformy, která je zajištěna pomocí hypoxického transkripčního faktoru HIF1- $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1). Autoři hypotetizují, že by mohla souviset se strukturními změnami týkajícími se sestavování superkomplexů při adaptaci na hypoxii a upravovat specifickou aktivitu COX (Hwang et al. 2015).

## 2.7 Cox7b izoformy

Tato podjednotka s transmembránovým helixem má dvě izoformy, Cox7b-1 a Cox7b-2. V rámci genu COX7B pro izoformu Cox7b-1 byla u dvou pacientů s MLS syndromem (microphthalmia with linear skin lesions) nalezena záměnná a nesmyslná (nonsense) mutace. Autoři studie také navodili sníženou expresi Cox7b-1 v HeLa buňkách, které vykazovaly snížené množství asemblovaného COX holoenzymu spolu se sníženou spotřebou kyslíku. Delece genu COX7B v modelovém organizmu, rybě medace japonské (*Oryzias latipes*), vedla



k rekapitulaci fenotypu lidských pacientů. Výsledky této studie naznačují důležitost Cox7b-1 podjednotky v COX asemblaci a aktivitě (Indrieri et al. 2012).

Pro Cox7b-2 izoformu byl anotován gen na lidském chromosomu 4 (COX7B2), ačkoli prozatím nebyly objeveny žádné specifické funkce této izoformy. Avšak u myši je tato izoforma exprimována pouze testikulárně, tedy rozšiřuje skupinu proteinů s touto tkáňově specifickou expresí (Cox6b-2, cytochrom *c*), která může adaptovat metabolismus samčích reprodukčních orgánů (Kadenbach & Hüttemann 2015). U čínských pacientů s karcinomem nosohltanu bylo popsáno pět vzácných jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) v COX7B2 genu, z nichž jeden vede k substituci aminokyseliny (His26Gln). Pokud se identifikuje Cox7b-2 v nádorových buňkách, mohla by se dle SNPs určit predispozice k tomuto onemocnění (Liang et al. 2004).

## 2.8 Cox7c

Cox7c je podjednotkou s transmembránovým helixem, která je v kontaktu s katalytickými podjednotkami Cox1 a Cox2. Prozatím není známa žádná její specifická funkce.

## 2.9 Cox8 izoformy

Transmembránový helix tvořící podjednotku je v kontaktu s helixy Cox1 (Tsukihara et al. 1996). Podjednotka Cox8 vykazuje tři různé izoformy. Cox8-H je exprimována ve svalových buňkách a Cox8-L se vyskytuje ve všech ostatních tkáních (Merle & Kadenbach 1980). Cox8-H byla navíc nalezena v hnědé tukové tkáni (BAT) potkana, zatímco ostatní podjednotky s H/L izoformami (Cox6a a Cox7a) jsou zde zastoupeny v L izoformě (Kadenbach et al. 1990). Člověk má pouze L-typ podjednotky. Cox8-H izoforma ztratila funkci a stala se pseudogenem za probíhající koadaptace Cox8 s podjednotkou Cox1 (Goldberg et al. 2003). Předpokládá se druhově specifická adaptace této podjednotky vzhledem k tomu, že u pstruha duhového byla nalezena také pouze Cox8-L izoforma (Freund & Kadenbach 1994). V recentní publikaci byla popsána mutace Cox8-L u pacientů s Leigh-like syndromem s leukodystrofií a epilepsií. Mutace (115-1G>C) má za následek aberantní sestřih s výsledným snížením množství podjednotky, což vede ke snížení celkového množství COX. Funkcí této podjednotky tak nejspíš není regulace aktivity, ale je esenciální pro stabilitu enzymu (Hallmann et al. 2016). Třetí izoforma této podjednotky, Cox8-3, byla identifikována nálezem homologního genu u člověka, lemura, potkana a myši, ale její tkáňová specifita je neznámá (Hüttemann, Schmidt, et al. 2003).

### 3. Podjednotka Cox4

Cox4, největší z jaderně kódovaných podjednotek, sestává z transmembránového helixu, cytosolické a matrixové domény (ty disponují každá dvěma helixy). Transmembránový helix Cox4 asociuje s helixy podjednotek Cox1, Cox7b a Cox8 (Tsukihara et al. 1996). Sousedství s katalytickým jádrem enzymu předurčuje Cox4 k roli kandidáta pro regulaci COX aktivity. Zdá se, že může být důležitá i z hlediska dokování cytochromu *c* k vazebnému místu na COX (podjednotce Cox2), podobně jako podjednotka Cox6b (Sampson & Alleyne 2001).

#### 3.1 Alosterická regulace

U podjednotky Cox4 byla nalezena ATP/ADP vazebná místa, která mohou “vnímat” energetický stav buňky a v závislosti na něm regulovat aktivitu enzymu. Jedno ATP/ADP vazebné místo bylo nalezeno v transmembránové doméně Cox4 podjednotky, přičemž při vysokém cytosolickém ATP/ADP poměru (je tedy vázáno ATP) dochází ke snížení afinity cytochromu *c* ke COX a tím je její aktivita inhibována (Napiwotzki & Kadenbach 1998). V matrixové doméně Cox4-1 byla prokázána vazba ATP, která vede k alosterické inhibici enzymatické aktivity COX za vysokého intramitochondriálního ATP/ADP poměru (Arnold & Kadenbach 1997). Alosterická ATP-inhibice COX však může probíhat pouze tehdy, pokud je Cox1 na cytosolické straně fosforylována cAMP-dependentní proteinkinázou A (PKA) (Bender & Kadenbach 2000). Jedním z možných fosforylačních míst je Ser441 Cox1 podjednotky, který je *in vitro* fosforylován za přítomnosti cAMP a PKA (Lee et al. 2002). Při *in vivo* fosforylaci na jiném epitopu Cox1 podjednotky, Tyr304, dochází k inhibici i v přítomnosti alosterického aktivátoru ADP (Lee et al. 2005). Tento mechanismus regulace, který je autory označován jako “druhý mechanismus respirační kontroly“, probíhá nezávisle na mitochondriálním membránovém potenciálu (Kadenbach & Arnold 1999). V souvislosti s tím bylo navrženo, že alosterická ATP-inhibice zajišťuje udržování membránového potenciálu na nízkých hodnotách a tím slouží jako prevence vzniku ROS, přičemž ke zvyšování membránového potenciálu

a vzniku ROS dochází při stresu vypnutím této kontroly defosforylací pomocí fosfatáz (Kadenbach et al. 2004; Kadenbach et al. 2013; Ramzan et al. 2010). Alosterické inhibici zabraňuje fosforylace Ser58 mitochondriální PKA na matrixové straně Cox4-1 izoformy, jak bylo přímo prokázáno specifickou mutagenezí inkriminovaného serinu. Dráha mitochondriální PKA je pozitivně regulována uhličitánem na úrovni mitochondriální adenylát cyklázy. Ke zvýšení koncentrace uhličitanu dochází při zvýšené aktivitě Krebsova cyklu a fosforylací indukované zvýšení COX aktivity může napomoci sladit rychlosti mitochondriálních



intramolekulárního disulfidického můstku. Nicméně je zajímavý svou konzervovaností napříč druhy oproti Cox4-1 izoformě, kde je tato pozice vysoce variabilní. Molekulární modelování lidské Cox4-2 odhalilo možnost vytvoření cysteinového můstku mezi Cys16 a Cys30 pouze malou strukturální změnou v oblasti smyčky, jež se vytváří mezi nimi, oproti predikované struktuře (Hüttemann et al. 2001). Naopak konzervovanou částí mezi izoformami je transmembránová část kontaktující helixy Cox1.

### 3.3 Cox4 izoformy – exprese a funkce

Cox4-1 izoforma byla identifikována ve všech tkáních, na rozdíl od Cox4-2, která vykazuje tkáňově specifickou expresi. Northern blot analýzou lidské RNA různých tkání byla zjištěna signifikantní míra exprese Cox4-2 v adultní a fetální plicní tkáni a fetálním svalstvu. Konzistentní výsledky byly získány kvantitativním PCR tkání z potkanů, kdy nejvyšší obsah byl stanoven v plicích, poté v srdci a mozku. V ostatních tkáních byla již téměř nedetekovatelná množství této izoformy (Hüttemann et al. 2001).

Později byla zaznamenána nízká hladina exprese Cox4-2 izoformy v neuronech, konkrétně granulárních buňkách mozečku myši (Horvat et al. 2006). V této studii byly porovnány funkčně odlišné cerebelární neurony s kortikálními astrocyty, které exprimují za normoxie výhradně Cox4-1 izoformu. Obě linie vykazovaly po kultivaci v hypoxické komoře zvýšenou expresi izoformy Cox4-2. Následně bylo při měření respirace pozorováno, že pokud je i relativně málo transkribovaná Cox4-2 izoforma, nedochází k alosterické ATP-inhibici za vysokého ATP/ADP poměru. Pravděpodobně tedy nedochází k vazbě ATP na matrixovou doménu Cox4-2 či nedojde k progresi konformační změny ke katalytickému jádru. Příčinou může být odlišná struktura izoformy, jež může vytvářet již zmíněný disulfidický můstek. Odlišnost v C-terminálním konci vystupujícím do mezimembránového prostoru by naopak mohla ovlivňovat vazbu cytochromu *c* na izozym s Cox4-2 a tím i aktivitu enzymu (Hüttemann et al. 2001; Horvat et al. 2006). Autoři předpokládají roli COX jako kyslíkového senzoru, který astrocytům umožní při hypoxii přejít na anaerobní metabolismus (glykolýzu), zatímco neurony vyžadující velké množství energie se snaží dohnat malou dostupnost energetických substrátů na úkor zranitelnosti (Horvat et al. 2006). Obdobně další studie poukazuje na vyšší expresi Cox4-2 izoformy a naopak úbytek Cox4-1 u striálních astrocytů po kultivaci s 3-nitropropionovou kyselinou (mitochondriální toxin, *in vitro* model Huntingtonovy choroby). Tím autoři navrhuji indukovanou transkripci Cox4-2 izoformy nejen na základě hypoxie, ale také v souvislosti s toxiny. Stejný charakter mělo i vyrušení alosterické ATP-inhibice při vyšší transkripční úrovni Cox4-2 izoformy (Singh et al. 2009).

COX izolovaná z bovinních plic obsahuje přibližně stejné množství Cox4-1 a Cox4-2 izoformy a vykazuje dvakrát vyšší aktivitu oproti jaternímu enzymu obsahujícímu jen Cox4-1 (Hüttemann, Lee, et al. 2012). Tato skupina získala výsledky, které potlačení alosterické ATP-inhibice izozymem s Cox4-2 v bovinních plicích nenavědčují a COX aktivita je i zde regulována na základě ATP/ADP poměru. Konzistentní byly i výsledky Cox4-2-KO myši, u kterých byla signifikantně snižena aktivita plicní COX a hladina buněčného ATP oproti WT myším. Jak u KO, tak u WT myši byla pozorována alosterická ATP-inhibice. COX4-2-KO myši vykazovaly patologii plic zhoršující se s věkem, včetně akumulace Charcot-Leyden krystalů. Cox4-2 izoforma je tedy nezbytná pro normální fungování plic. Autoři navrhuji OXPHOS jako terapeutický cíl pro plicní patologie, např. astma (Hüttemann, Lee, et al. 2012).

Ačkoli byl v rámci některých studií zjištěn vyšší enzymatický obrat Cox4-2 obsahující COX (Hüttemann, Lee, et al. 2012; Fukuda et al. 2007), existuje i studie, jejíž výsledky jsou opačné a celá otázka, zda je aktivnější Cox4-1 či Cox4-2 obsahující enzym, se stává kontroverzní (Oliva et al. 2015). Autoři této studie zjistili, že exprese Cox4-1 izoformy se zvyšuje v lidských gliomech působením epigenetického genového silenceru BMI1 (který je vysoce exprimován v různých typech nádorů u člověka) a jejich kooperativní regulace má u pacientů za následek zhoršení prognózy ve srovnání s pacienty s Cox4-2 izoformou. Cox4-1 obsahující enzym měl aktivitu překvapivě a signifikantně vyšší než enzym s Cox4-2. Kontroverzní data autoři vysvětlují odlišnostmi mezi různými typy buněk, použitím mitochondriální frakce k měření oproti solubilizovanému enzymu a odlišným obsahem superkomplexů (Oliva et al. 2015).

### **3.4 Evoluce kyslíkové senzitivity**

Prokaryota mají schopnost přizpůsobit se svému okolí díky rozmanitosti metabolických drah. Není tomu jinak ani v respiračním řetězci, kde za různých okolností využívají jednu z více terminálních oxidáz, čímž mohou regulovat efektivitu OXPHOS, například za normoxie či hypoxie. Podobným mechanismem regulace dle koncentrace kyslíku disponují i rostliny, které využívají alternativní terminální oxidázy (AOX). Hlavní funkcí AOX je předcházení přílišné redukci ubichinononu za nedostatku kyslíku (jako terminálního akceptoru elektronů) a tím chrání před vznikem ROS. (Gupta et al. 2009) Tyto AOX byly objeveny i u některých živočišných kmenů (Cnidaria, Annelida, Mollusca, Nematoda, Chordata), což naznačuje možnou roli AOX v evoluci elektron-transportního řetězce (McDonald et al. 2009). Jelikož žádná z AOX nebyla nalezena v rámci obratlovců, předpokládá se její sekundární ztráta

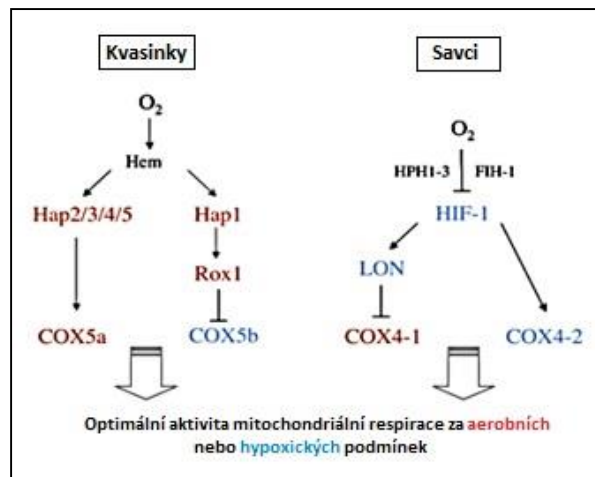
(McDonald et al. 2009). Ta pravděpodobně provázela celogenomovou duplikaci a vznik párů izoform jaderně kódovaných podjednotek (Little et al. 2010). Jednou z nich jsou izoformy Cox4 podjednotky. Exprese této podjednotky má na buňku stejný dopad, jako exprese AOX. Je tedy alternativní cestou ke snížení produkce ROS za hypoxie (Fukuda et al. 2007).

U *Saccharomyces cerevisiae*, která také disponuje izoformovým párem regulovaným koncentrací kyslíku, rovněž došlo ke ztrátě AOX (McDonald et al. 2009). Je otázkou, zda se jedná o konvergentní evoluci této regulace mezi kvasinkami a obratlovci, neboť nízká homologie promotorů a aminokyselinové sekvence tomu nenasvědčuje (Pierron et al. 2012). Dále, u savců je „hypoxická“ izoforma neustále exprimována i ve vysoce okysličené plicní tkáni a tak se zdá být primárně adaptovaná k prostředí s vysokou koncentrací kyslíku (Hüttemann et al. 2007). Oproti tomu se kvasinková exprimuje pouze díky indukci hypoxií (Kwast et al. 1998).

### **3.5 Cox4 izoformy – mechanismus regulace exprese v hypoxii**

U mnoha savčích buněčných linií již byla zaznamenána odpověď buněk na hypoxii zvýšenou expresí Cox4-2 izoformy. Pozorováno bylo zvýšení Cox4-2 mRNA u buněk hladké svaloviny plic potkana a HEK 293 buněk (Aras et al. 2013), u myších astrocytů (Horvat et al. 2006), u lidských plicních buněk H460 (Hüttemann et al. 2007), u lidských HeLa, Hep3B, Hct116 a A594 buněk (Fukuda et al. 2007). Předpokládá se, že změna v izoformové expresi je řízena signální drahou, jež je závislá na parciálním tlaku kyslíku v buňce. Na otázku, o jaké regulátory se jedná, odpovídá několik výzkumných skupin různými hypotézami, které se navzájem nemusí nutně vylučovat.

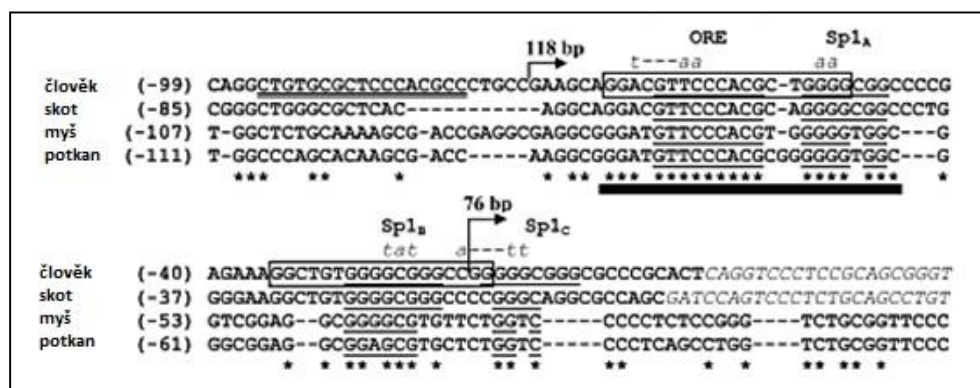
Jedna studie předkládala hypotézu, že je exprese Cox4 izoform u savců regulována za hypoxie díky HIF-1 (Fukuda et al. 2007). HIF-1 je transkripčním aktivátorem regulujícím kyslíkovou homeostázu živočichů, který za hypoxie aktivuje například i geny pro glykolytické enzymy, čímž podporuje anaerobní metabolické dráhy za nedostatku kyslíku (Seagroves et al. 2001). V promotoru lidského genu pro Cox4-2 byly objeveny konsenzus sekvence HREs (hypoxia-response elements), HRE1 na 5' konci a HRE2 v intronu 1, které jsou cílovým místem pro vazbu HIF-1. HIF-1 by se tedy mohl do těchto míst vázat a zvyšovat transkripční úroveň Cox4-2 izoformy za hypoxických podmínek. Zároveň se předpokládala HIF-1- dependentní degradace Cox4-1 izoformy mitochondriální proteázou LON v buňkách vystavených hypoxii, kdy HIF-1 indukuje LON expresi (Fukuda et al. 2007).



**Obrázek 8: HIF-1 mechanismus změny exprese izoform Cox4 (upraveno z Fukuda et al. 2007)**

Na levé části obrázku je zobrazen mechanismus změny exprese izoform u kvasinky, který závisí na kyslíkem regulované syntéze hemu. Hap2/3/4/5 aktivují gen Cox5a a Hap1 aktivuje Rox1, který reprimuje expresi Cox5b izoformy (přičemž Cox5a je homologní k savčí Cox4-1, Cox5b ke Cox4-2). Na pravé části je zobrazen hypotetický mechanismus HIF-1 dependentní hypoxické odpovědi u savců. Aktivita HIF-1 je inhibována HPH1-3 a FIH-1 hydroxylázami, které jako substrát využívají kyslík (Fukuda et al. 2007).

Současně vyšla studie, která objevila 24-bp dlouhou konzervovanou oblast (ORE-oxygen responsive element, 13-bp) v proximální promotorové oblasti Cox4-2 genu myši, potkana, skotu a člověka (Hüttemann et al. 2007). Analýza lidského promotoru také odhalila 3 Sp1-like elementy (Sp1<sub>A</sub>, Sp1<sub>B</sub>, Sp1<sub>C</sub>), přičemž jeden z nich (Sp1<sub>A</sub>) je součástí konzervované oblasti a všechny jsou zapotřebí pro maximální promotorovou aktivitu (Hüttemann et al. 2007).



**Obrázek 9: Alignment Cox4-2 promotorové sekvence (upraveno z Hüttemann et al. 2007)**

Shodné báze jsou označeny hvězdičkou. Vazebná místa transkripčních faktorů jsou podtržena. Finální konsenzus sekvence byla stanovena na oblast 5'-GGA(C/T)NTTCNCACG(C/T)-3'. (Hüttemann et al. 2007)  
Dvakrát podtržená je oblast domnělé HRE1 vázající HIF-1 (Fukuda et al. 2007).

Později byly v HEK293 buňkách odhaleny kandidátní faktory vázající ORE (OREFs), u kterých byla potvrzena vazba v oblasti ORE v lidském promotoru Cox4-2 genu pomocí

analýzy změn elektroforetické mobility (EMSA). Jako aktivátory transkripce byly identifikovány RBPJ (recombination signal sequence binding protein J<sub>κ</sub>), který má hlavní roli v evolučně konzervované NOTCH signální dráze, a CHCHD2 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain 2, alternativně MNRR1), jehož gen je koexprimován s jinými geny pro OXPHOS proteiny. Tyto faktory (RBPJ, CHCHD2) společně umožňují hypoxickou aktivaci Cox4-2 promotoru. Knockdown RBPJ (HEK293-RBPJ-KD) snižuje hypoxickou odpověď zprostředkovanou CHCHD2 faktorem a tudíž jsou oba nezbytné pro optimální regulaci promotoru. Jako represor, který je aktivní především za normoxie, byl určen CXXC5 (CXXC finger protein 5). Při normoxii byla zaznamenána výrazně snížená reportérová aktivita při nadměrné expresi CXXC5 faktoru, což naznačuje negativní regulaci ORE za pomoci CXXC5. Koimunoprecipitací a následnou Western blot analýzou byla zjištěna interakce RBPJ s CXXC5 a s CHCHD2, což naznačuje provázanost regulace těmito faktory, přičemž je tato regulace nezávislá na HIF-1 $\alpha$ . Pokud je CHCHD2 nadměrně exprimovaná, potlačí represi CXXC5 faktorem. Ke zvýšení úrovně CHCHD2 mRNA, ale i proteinu, dochází nejvíce při hypoxii (4% koncentraci kyslíku), kdy je promotor Cox4-2 maximálně aktivní (Aras et al. 2013). MNRR1-OE HEK293 buňky vykazovaly zvýšenou úroveň exprese jak endogenního, tak transfekovaného genu, což nasvědčuje tomu, že MNRR1 aktivuje také expresi svého genu (Aras et al. 2015). Konzistentní výsledky byly získány také experimenty provedenými s primárními plicními buňkami potkana s endogenní expresí Cox4-2 izoformy (Aras et al. 2013).

Další studie představuje výsledky screenu (qPCR) mRNA exprese jaderně kódovaných genů v myších embryonálních fibroblastech (MEFs), kde se porovnává exprese HIF1- $\alpha$ -WT a HIF1- $\alpha$ -KO buněk při kontrolních podmínkách a v hypoxii (1% kyslíku). Cox4-2 vykazovala vyšší expresi za hypoxie v HIF1- $\alpha$ -KO buňkách oproti HIF1- $\alpha$ -WT buňkám (Hwang et al. 2015). Tato data nasvědčují tomu, že HIF-1 nebude hlavním faktorem hypoxické regulace exprese Cox4-2.

Argument vyvracející HIF-1 hypoxickou regulaci exprese Cox4 izoformou vyplývá z měření aktivity reportérového genu s Cox4-2 promotorem v H460 buňkách za různé koncentrace kyslíku (od anoxie po normoxii). Nejvyšší aktivita byla stanovena na 4% kyslíku, zatímco nejvyšší aktivita HRE reportéru odpovídá anoxii (Hüttemann et al. 2007). HIF-1 regulace je tedy nepravděpodobná při fyziologických podmínkách a připadá v úvahu za podmínek patologických (Hüttemann et al. 2007).



## 4. Proteiny asociované s COX

Ačkoli již byla popsána krystalová struktura COX, která zahrnuje 13 podjednotek, postupně jsou objevovány další proteiny ovlivňující funkci COX, které komigrují s enzymem v nativních elektroforézách. Může se jednat o proteiny slaběji vázané, které podléhají disociaci při solubilizaci enzymu předcházející strukturním studiím, případně se vyskytující ve substechiometrických poměrech vzhledem k ostatním podjednotkám, analogicky např. jako nově objevené podjednotky MLQ a DAPIT mitochondriální ATP syntázy (Walker 2012). Přes nejasnou strukturní příslušnost ke COX se ale jedná o proteiny významně ovlivňující funkci enzymu a jeho sdružování do respiračních superkomplexů.

### 4.1 MNRR1

Jedním z těchto proteinů je již zmíněný MNRR1 (CHCHD2), který se primárně uplatňuje v hypoxické regulaci exprese Cox4-2 izoformy (Aras et al. 2013). Nicméně to není jeho jediná úloha.

Jeho funkce v rámci OXPHOSu byla poprvé popsána na MNRR1-KD imortalizovaných lidských fibroblastech, které měly sníženou spotřebu kyslíku o 40% (Baughman et al. 2009). Později byla koimunoprecipitací prokázána vazba MNRR1 na COX a pomocí SDS-PAGE bylo detekováno jeho substechiometrické množství vzhledem ke COX1 a COX2 podjednotkám (Aras et al. 2015). Měření aktivity COX naznačuje vliv tohoto proteinu na funkci COX. MNRR1-KD HEK293 buňky vykazovaly signifikantní snížení COX aktivity a spotřeby kyslíku oproti HEK293-WT buňkám, zatímco u MNRR1-OE HEK293 buněk se jak aktivita COX tak spotřeba kyslíku zvýšila. Dále, po přidání izolovaného proteinu MNRR1 (rekombinantně produkovaného v *E.coli*) došlo ke zvýšení aktivity izolované a purifikované COX *in vitro*. Dále měly MNRR1-KD buňky výrazně snížený membránový potenciál a produkovaly více ROS (Aras et al. 2015). Stejně jako Cox4-2 i MNRR1 obsahuje cysteinová residua a tudíž může v závislosti na oxidačně-redukčních podmínkách tvořit disulfidické můstky, jež by mohly sloužit jakožto senzor oxidačního stresu a podmiňovat následnou signalizaci. Je otázkou, zda by signální dráha mohla zahrnovat i translokaci MNRR1 z mitochondrií do jádra, kde se účastní transkripční aktivace Cox4-2 (Hüttemann et al. 2001; Aras et al. 2015).

Usuzuje se tedy, že jde o protein, který má nejspíše funkci v regulaci dimerické formy COX, vzhledem k substechiometrickému množství vůči podjednotkám COX, případně že reguluje tvorbu COX superkomplexů (Aras et al. 2015).

## 4.2 NDUFA4

NDUFA4 je proteinem, kterému se původně přisuzovala funkce strukturní podjednotky komplexu I, NADH dehydrogenázy (Carroll et al. 2003). Nicméně pozdější studie naznačují možnou asociaci s COX (Balsa et al. 2012; Pitceathly et al. 2013). Fakt, že NDUFA4 nebyla objevena na krystalové struktuře COX, která obsahuje 13 podjednotek, vysvětlují autoři studií tím, že může dojít ke ztrátě při purifikaci za použití vyšší koncentrace detergentu dodecyl maltosidu (DDM), který naruší vazbu ke komplexu (Tsukihara et al. 1996; Balsa et al. 2012; Pitceathly et al. 2013).

Při BN-PAGE myších fibroblastů byla zjištěna migrace NDUFA4 společně s COX či se superkomplexy COX obsahujícími, nikoli s komplexem I samotným. Ke komigraci NDUFA4 a COX docházelo i u komplex I-deficientních buněk, zatímco v COX-KO buňkách se ztrátou COX indukovanou COX10 delecí došlo k vymizení NDUFA4 společně s ostatními COX podjednotkami. Pomocí proteomických analýz myších i lidských fibroblastů byly získány výsledky potvrzující domněnku o souvislosti NDUFA4 s COX. Utišením exprese NDUFA4 v HeLa buňkách došlo ke snížení množství COX, zatímco následnou ektopickou expresí NDUFA4 se množství COX regenerovalo. Komplex I nebyl umlčením NDUFA4 nijak zasažen. Pátrání po homologních sekvencích NDUFA4 odhalilo jeho výskyt i v organismech, které komplex I v evoluci ztratily (nebyla potvrzena „koevoluce“), a tudíž posiluje tvrzení o roli v COX (Balsa et al. 2012).

V genu pro NDUFA4 byla objevena homozygotní mutace donorového místa sestřihu (c.42+1G → C), která má za následek deficienci COX spojenou s Leigh syndromem, přičemž jiné mutace v genech způsobujících tuto patologii nebyly u pacientů prokázány. Dochází k posunu čtecího rámce a vzniku předčasného stop kodónu. Vzniká tak protein se 14 aminokyselinami ve čtecím rámci, které následuje 35 aminokyselin mimo čtecí rámec oproti normálnímu proteinu o 81 aminokyselinách. Autoři předpokládají, že NDUFA4 nemá roli COX asemblačního faktoru ani není nezbytný pro katalytickou funkci, ale je pravděpodobně potřebný pro aktivaci COX funkce po biogenezi a zůstává s ní nadále volně vázán (Pitceathly et al. 2013).

## 4.3 Rcf1 a Rcf2 (Respiratory Supercomplex Factor 1/2)

Rcf1 a Rcf2 jsou integrální proteiny lokalizované v IMM *Saccharomyces cerevisiae*. Homology Rcf1 byly identifikovány v rámci kvasinek, rostlin i savců, zatímco Rcf2 je konzervován pouze u kvasinek (Vukotic et al. 2012; Y. C. Chen et al. 2012). Jejich spojitost se superkomplexy respiračního řetězce byla charakterizována hmotnostní spektrometrií komplexů separovaných pomocí BN-PAGE a potvrzena Western blot analýzou (Vukotic et al. 2012).

Konkrétněji byla definována jejich kolokalizace se superkomplexy obsahujícími COX a s COX samotnou, zatímco u mitochondrií s deletovanou COX, kde byly nacházeny pouze dimery komplexu III, detekovány nebyly (Vukotic et al. 2012; Strogolova et al. 2012).

Pomocí kmenů s poruchou v sestavování COX enzymu bylo prokázáno, že Rcf1 interaguje především s Cox3 podjednotkou, přičemž je tato interakce nezávislá na asemblačním stavu COX a je stabilní i za přítomnosti detergentu Triton X-100 (Y. C. Chen et al. 2012; Strogolova et al. 2012). Tato interakce je zprostředkována přes Hig1 homologní doménu Rcf1 proteinu (na N-terminálním konci proteinu) (Strogolova et al. 2012). Rovněž byly zjištěny interakce Rcf1 s podjednotkami Cox1, Cox2 a Cox4, které jsou ovšem velice slabé (Y. C. Chen et al. 2012; Strogolova et al. 2012). Mimo to byla objevena asociace Rcf1 s cytochrom *bc<sub>1</sub>* komplexem, která je stabilní po solubilizaci velmi mírným detergentem digitoninem, avšak na Triton X-100 a DDM je citlivá (Strogolova et al. 2012; Vukotic et al. 2012; Y. C. Chen et al. 2012). Zdá se tedy, že Rcf1 interaguje s cytochromem *bc<sub>1</sub>* především, pokud je součástí superkomplexů (ty nejsou solubilizací digitoninem narušeny oproti Tritonu X-100 a DDM) (Y. C. Chen et al. 2012).

I u Rcf2 byla prokázána vazba na cytochrom *bc<sub>1</sub>*-COX superkomplexy, která je stabilnější po solubilizaci digitoninem než ta s Rcf1, avšak při použití Triton X-100 nebyla pozorována. Dále, vazba Rcf2 na samotnou Cox3 podjednotku detekována nebyla. Autoři tedy předpokládají, že vazba Rcf2 je stabilní pouze v případě, kdy je superkomplex kompletní (Strogolova et al. 2012).

Haploidní kmeny s delecí v RCF1 nebo RCF2 genu (RCF1-KO, RCF2-KO) nevykazovaly oproti kontrole žádné signifikantní změny v růstu na médiu s glukosou, avšak na médiích s nefermentovatelným zdrojem uhlíku měly RCF1-KO kmeny růst zhoršený (Strogolova et al. 2012; Vukotic et al. 2012; Y. C. Chen et al. 2012). Naměřená enzymatická aktivita COX byla snížena pouze částečně, přičemž výrazněji nižší aktivitu vykazoval RCF1-KO kmen a u RCF2-KO bylo snížení minimální (Vukotic et al. 2012; Strogolova et al. 2012; Y. C. Chen et al. 2012). Pokud však delece postihla oba geny (RCF1 i RCF2 zároveň), došlo k výraznému zhoršení růstu na médiu s nefermentovatelným zdrojem uhlíku (Vukotic et al. 2012; Strogolova et al. 2012). Obdobné zhoršení růstu bylo pozorováno u mitochondrií postrádajících Cox6a (Vukotic et al. 2012). Enzymatická aktivita COX RCF1-RCF2-KO byla na 20% úrovni oproti kontrole a byla zcela obnovena expresí Rcf1, expresí Rcf2 byla obnovena jen částečně (Strogolova et al. 2012). Experimenty odhalily vysokou citlivost RCF1-KO k hypoxii, přestože buňky rostly na fermentovatelném médiu. Byla také pozorována zvýšená produkce ROS v RCF1-KO a RCF2-KO (Vukotic et al. 2012).

U RCF1-KO a RCF1-RCF2-KO mitochondrií bylo pozorováno částečné snížené množství proteinů Cox1, Cox2 a Cox3 podjednotek, což nasvědčuje důležitosti Rcf1 pro stabilizaci těchto proteinů (Strogolova et al. 2012). V RCF1-KO buňkách došlo ke snížení množství Cox6a podjednotky, které nebylo zapříčiněné importem do mitochondrií. Tudíž, pro assemblaci podjednotky Cox6a do komplexu je Rcf1 důležité, ale není nezbytné (Vukotic et al. 2012).

V mitochondriích kvasinek *S. cerevisiae* je většina superkomplexů kvůli nepřítomnosti komplexu I ve formě  $\text{III}_2\text{IV}_2$ , přičemž u RCF1-KO a RCF1-RCF2-KO se shlukovaly především superkomplexy  $\text{III}_2\text{IV}_1$  a dimery  $\text{III}_2$  (ne u RCF2-KO) (Vukotic et al. 2012; Strogolova et al. 2012; Y. C. Chen et al. 2012). Přítomnost těchto superkomplexů (a studie proteinů mutantů centrifugací na sacharózovém gradientu) nasvědčuje možnému defektu assemblace periferních podjednotek COX v nepřítomnosti Rcf1 a Rcf2. Tyto periferní podjednotky se zdají být nezbytnými pro asociaci COX do superkomplexů (Strogolova et al. 2012). Potvrzení se dostalo díky BN-PAGE kontrolních mitochondrií, které obsahovaly Cox6b a Cox6a podjednotky především v  $\text{III}_2\text{IV}_2$  superkomplexu, přičemž RCF1-KO a RCF1-RCF2-KO vykazovaly snížené množství obou těchto podjednotek (Strogolova et al. 2012). Vysvětlením tak může být odlišné složení COX monomerů, tudíž s komplexem III asociuje pouze jejich frakce neovlivněná ztrátou Rcf1. V souladu bylo zjištěno, že Cox6a podjednotka byla asociována pouze s částí celkové COX v mitochondriích a většina COX komplexů se zdá být složena bez Cox6a podjednotky (Vukotic et al. 2012). Nasvědčuje tomu i fakt, že delece genu COX13 kódujícího Cox6a nemá za následek narušení interakce Rcf1 s COX, avšak dochází ke snížení množství  $\text{III}_2\text{IV}_2$  superkomplexů, podobně jako u RCF1-KO (Y. C. Chen et al. 2012). Delece RCF1 a COX13 zároveň má za následek téměř úplnou ztrátu  $\text{III}_2\text{IV}_2$  superkomplexů (Y. C. Chen et al. 2012). Nadměrná exprese Rcf1 podporuje tvorbu superkomplexů, kdy se zvýšilo množství  $\text{III}_2\text{IV}_2$  a  $\text{III}_2\text{IV}_1$  forem (Y. C. Chen et al. 2012).

Výsledky studie nasvědčují tomu, že vazba jednotlivých proteinů k superkomplexu na sobě není závislá a navrhuje myšlenku dvou odlišných forem superkomplexů, které asociují buď přes Rcf1, či přes Rcf2 (Strogolova et al. 2012). Proteinu Rcf1 je také navržena funkce Cox3-specifického chaperonu, který ovšem není standardní především pro svou přetrvávající vazbu i po maturaci enzymu a faktu, že jeho nepřítomnost assemblaci Cox3 do enzymu nijak závažně nenarušuje. Vazba Rcf1 a Cox3 může konformačními změnami ovlivňovat aktivitu COX. Navíc, interakce Rcf1 jak s AAC proteiny, tak se superkomplexy by mohla zprostředkovávat komunikaci těchto proteinů a regulovat aktivitu OXPHOS komplexu dle potřeb buňky (Strogolova et al. 2012). Rcf1 je bezesporu důležitým článkem mezi třetím

a čtvrtým komplexem respiračního řetězce při vytváření kvasinkových superkomplexů (Vukotic et al. 2012; Strogolova et al. 2012; Y. C. Chen et al. 2012).

Studie využívající jako model *Podospora anserina* rovněž poukazuje na důležitost Rcf1 pro stabilitu superkomplexů i samotné COX, kdy ztráta Rcf1 vede ke snížení množství superkomplexů ( $I_1III_2IV_{1-2}$ ), snížení respirace závislé na COX a k aktivaci AOX respirace. Rovněž docházelo ke zvýšení ROS produkce a ke snížení antioxidačních proteinů v RCF1-KO mitochondriích. Navíc byla objevena zvláštní, v gelu rychleji migrující, COX, která je specifická pro ztrátu Rcf1. Rcf1 v *Podospora anserina* je tedy pravděpodobně podjednotkou či regulačním faktorem této specifické COX varianty, která se zdá být kruciální pro tvorbu  $I_1III_2IV_{1-2}$  superkomplexů (Fischer et al. 2015).

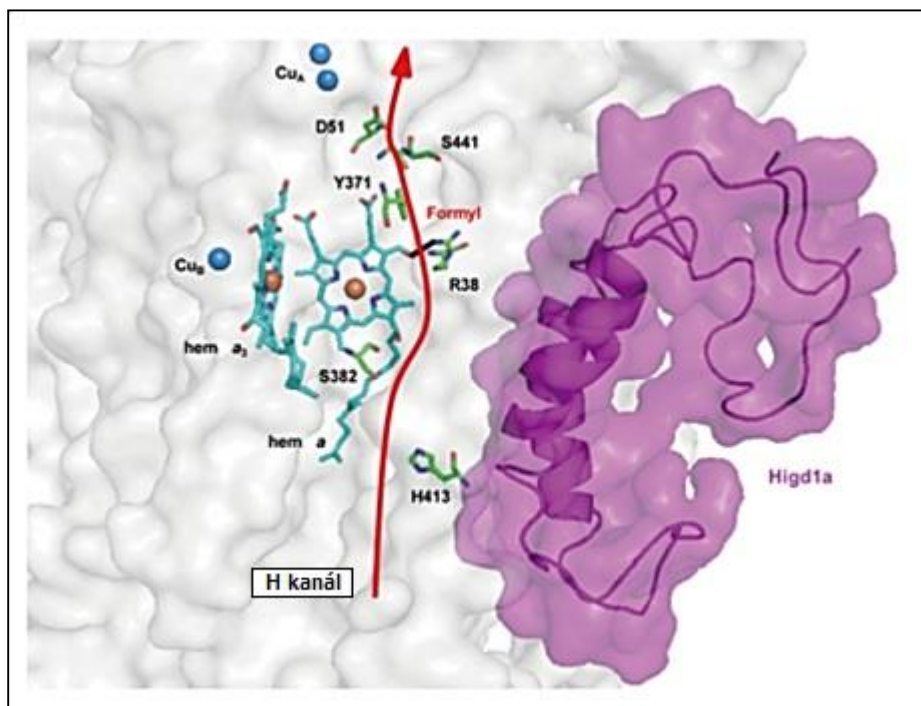
Rcf1 homologní proteiny byly nalezeny i u člověka, jsou jimi dvě varianty Rcf1a (alternativně Higd1a) a Rcf1b (Higd2a), které jsou rovněž proteiny IMM. Je u nich také známa asociace s COX komplexem (Vukotic et al. 2012). Oproti kvasinkám je u vyšších eukaryot možná hypoxická indukce izoform Higd1 proteinů typu 1 (Strogolova et al. 2012).

#### **4.4 Higd1a a Higd2a (Hypoxia inducible domain family member 1A/2A)**

Higd1a je protein, který je lokalizován v IMM, přičemž jeho exprese je indukovaná hypoxií. Pokusy s neonatálními potkaními kardiomyocyty vykazovaly zvýšenou expresi Higd1a za hypoxických podmínek (1% kyslíku) (Hayashi et al. 2015). Ačkoli je homologní vůči kvasinkovému Rcf1, funkci má pravděpodobně jinou, nesouvisející s tvorbou a stabilitou superkomplexů (Strogolova et al. 2012). Potvrzení se dostalo, když savčí buňky s delecí v HIGD1A nevykazovaly změny co se tvorby superkomplexů týče (Y. C. Chen et al. 2012).

Biochemickými metodami byla v myších kardiomyocytech prokázána přímá vazba endogenního Higd1a ke COX. Detailněji, pomocí Ramanovy spektroskopie, bylo poukázáno, že vazbou Higd1a dochází ke strukturní změně COX, jež má za následek částečnou změnu spinového stavu hemu *a* v aktivním centru enzymu (z nízkospinového na vysokospinový stav). Tato vazba má efekt na aktivitu COX a pravděpodobně i na tvorbu ATP. HIGD1A-KD buňky měly sníženou COX aktivitu, spotřebu kyslíku a dokonce i produkci ATP (buňky se zvýšenou expresí HIGD1A, HIGD1A-OE, právě naopak). Expresie rekombinantního Higd1a v HIGD1A-KD buňkách měla za následek komplementaci defektu. Hypoxická kultivace buněk vedla k mírnému poklesu ve hladině mitochondriálního ATP u HIGD1A-OE, zatímco k rychlému poklesu došlo u HIGD1A-KD (Hayashi et al. 2015).

Strukturní analýza odhalila štěrbinu na COX v blízkosti hemu *a*, do které se může Higd1a vázat a strukturní změnou okolí hemu *a* umožnit pumpování protonů H kanálem (viz obr. 10) Pravděpodobně jde tedy o endogenní pozitivní regulátor COX, který je indukován hypoxií a slouží k udržení produkce ATP přes OXPHOS za nedostatku kyslíku (Hayashi et al. 2015).



**Obrázek 10: Model vazby Higd1a ke COX (upraveno z Hayashi et al. 2015)**

Model naznačuje možné ovlivnění pumpování protonů skrz H-kanál (červeně) interakcí Higd1a (fialově) s COX (bíle).

Oproti Higd1a vykazuje Higd2a podobnou funkci jako jeho kvasinkový homolog Rcf1. V myších myoblastech s delecí v HIG2A se nevytvářely žádné superkomplexy obsahující COX, zatímco superkomplexy neobsahující COX postiženy nebyly a dokonce bylo jejich množství navýšeno. Zdá se tedy, že Higd2a má roli ve skládání a stabilizaci superkomplexů (Y. C. Chen et al. 2012).

## 4.5 SCAFI (Supercomplex assembly factor I)

SCAFI je protein podobný Cox7a podjednotce (alternativně je též označován jako Cox7a2-like nebo Cox7aR), jehož aminokyselinová sekvence je vysoce konzervována. Jeho funkce byla studována na embryonálních fibroblastech z myších kmenů (MEFs) s manipulovanou expresí SCAFI. SCAFI-KO MEFs měly sníženou aktivitu COX a mitochondriální produkci ATP, přičemž byla snížena i buněčná ATP produkce oproti SCAFI-WT. Byla zjištěna i narušená spotřeba kyslíku závislá jak na komplexu I, tak na

komplexu IV. Naopak, u SCAFI-OE MEFs se aktivita COX navýšila a zvýšil se i obsah SCAFI mRNA v kosterní svalovině a BAT (Ikeda et al. 2013).

U čtyřměsíčních SCAFI-KO myši byla oproti WT myším snížena COX aktivita o 15-30% ve vybraných svaích a vykazovaly pouze 70% výdrž při nuceném běhání na pásu. SCAFI-OE myši naopak vykazovaly zlepšení na 130% fyzického výkonu. SCAFI-KO myši mají pomalejší metabolismus, který inklinuje ke glykolýze. Zdá se tedy, že ztráta SCAFI má za následek sníženou mitochondriální oxidativní kapacitu a narušenou svalovou funkci při fyzické zátěži (Ikeda et al. 2013). Dále, u SCAFI-KO myši byla pozorována přeměna BAT na bílou tukovou tkáň, kdy se v BAT shromažďovaly tukové kapénky. Tyto myši byly citlivé na vystavení chladu (4°C), přičemž WT myši si za stejné teploty udržely tělesnou teplotu. SCAFI-KO myši měly sníženou hladinu mRNA pro rozpráhovací protein (Ucp1) v hnědé tukové tkáni, který se na termogenezi podílí. Navíc byla snížena exprese několika transkripčních faktorů důležitých pro mitochondriální funkci (Ikeda et al. 2013).

V superkomplexech byl SCAFI nacházen především v I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>n</sub> formě, jejíž množství je u SCAFI-KO buněk výrazně sníženo. Společně s tím došlo ke snížení obsahu dimerů COX, zatímco monomerní COX přibyla (Ikeda et al. 2013). SCAFI má tedy pravděpodobně roli v organizaci I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>n</sub> superkomplexů a může modulovat mitochondriální metabolismus. Autoři článku předpokládají možnou lokalizaci SCAFI na periférii COX po přidání Cox7a podjednotky a možnou inkorporaci do superkomplexů (Ikeda et al. 2013).

V jiné studii byl zjištěn obsah SCAFI v I<sub>1</sub>III<sub>2</sub>IV<sub>n</sub> a III+IV superkomplexech, přičemž jednotlivé COX či komplexy III jej neobsahovaly (Lapiente-Brun et al. 2013). V buněčných liniích (C57BL/6 a 129Sv kmenů) vykazujících tvorbu superkomplexů (SC<sup>+</sup>) byl SCAFI detekován, respektive jeho plná varianta. U SC<sup>-</sup> buněk, homozygotních pro o 6 bp kratší variantu SCAFI, byla tvorba superkomplexů obsahujících COX znovunastavena až zvýšenou expresí plné varianty SCAFI. Vyšší respirace dosahovaly fibroblasty transformované krátkou variantou SCAFI. Ovšem respirace za přítomnosti TMPD elektronového donoru byla obdobná u obou variant. Buňky obsahující plné SCAFI tak nevyužívají plný potenciál COX, pokud jsou kultivovány s glukózou. SC<sup>-</sup> fibroblasty vykazovaly maximální produkci ATP se substráty pyruvát+malát, nebo sukcinát. Oproti tomu SC<sup>+</sup> fibroblasty pro maximální produkci ATP potřebovaly kombinaci substrátů pro komplex I i II, což je efekt nepozorovaný u buněk postrádajících superkomplexy komplexu III a COX. Autoři tedy definují tři populace COX. První, přijímající elektrony pouze z NADH, druhou, přijímající elektrony pouze z FAD a třetí, která využívá obě cesty. Tyto tři populace mohou podporovat současnou oxidaci více substrátů,

kdy superkomplexy tvořené díky SCAFI snižují kompetitivní inhibici respirace mezi pyruvátem a sukcinátem (Lapiente-Brun et al. 2013).

Výše uvedené informace zpochybňuje recentní studie, ve které byl použit stejný myší kmen (C57BL/6) (Mourier et al. 2014). V experimentech se srdečními a jaterními mitochondriemi byla spotřeba kyslíku nezměněna použitím různých substrátů. Nebyla ani pozorována změna v tvorbě superkomplexů, kdy se do nich inkorporovaly jak COX, tak komplex III. Autoři tudíž nepředpokládají vliv SCAFI na jejich organizaci. Důležitou komponentou pro organizaci superkomplexů stanovili samotnou COX (Mourier et al. 2014).

## 4.6 Cox26

Cox26 je integrační protein IMM objevený v kvasinkách hmotnostní spektrometrií superkomplexů (Vukotic et al. 2012). Bylo zjištěno, že asociuje s podjednotkami COX (Cox1, Cox4, Cox5, Cox13) a cytochromu *bc<sub>1</sub>* v superkomplexech tvořených těmito komplexy. Jelikož nebyl nalezen v dimerech cytochromu *bc<sub>1</sub>* (III<sub>2</sub>), přisuzuje se mu asociace s COX. Dokonce byla pozorována asociace s monomerní COX. Jeho vazba na COX je narušena DDM solubilizací. Cox26 zůstává i za absence Rcf1 vázán na COX (Levchenko et al. 2016).

Studie růstu Cox26 mutantních kmenů na fermentovatelných i nefermentovatelných zdrojích uhlíku nasvědčují jeho postradatelnosti. Ani se nezdá, že by COX26 delece měla za následek snížení množství jiných mitochondriálních proteinů. Avšak dochází ke změně v hojnosti jednotlivých superkomplexů, kdy klesá množství III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> a naopak vzrůstá III<sub>2</sub>IV<sub>1</sub> a III<sub>2</sub>. Delece COX26 narušuje stabilitu superkomplexu III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>, ne jednotlivých komplexů. Spotřeba kyslíku Cox26 mutantních kmenů byla na 90% spotřeby nemutovaných buněk a podobně tomu tak bylo i s aktivitou enzymů. Oproti nemutovaným buňkám však bylo pozorováno snížení produkce ROS o 10% v Cox26 mutantech. Ačkoli nebylo pozorováno snížené množství asamblančních faktorů COX, bylo u COX26-KO buněk zjištěno hromadění COX asamblančních intermediátů. Zároveň docházelo k nižší inkorporaci Cox6a a Rcf1 do superkomplexů. COX26 delece má za následek ovlivnění asamblace COX, která vede ke snížené tvorbě superkomplexů (Levchenko et al. 2016).



## 5. Závěr

Cílem této práce bylo shrnout dosavadní poznatky o jaderně-kódovaných podjednotkách cytochrom *c* oxidázy, terminálního enzymu mitochondriálního elektron-transportního řetězce. Jejich výzkum byl po dlouhá léta spíše marginálním tématem v porovnání se studii zabývajícími se katalytickým mechanismem COX nebo procesem biogeneze enzymu, při které se uplatňují četné asemblační faktory, jejichž mutace jsou nejčastější příčinou vrozených onemocnění na podkladě COX deficiencie. Avšak v posledních letech byla popsána závažná, nejčastěji infantilní, onemocnění, za kterými se skrývají mutace právě v genech, které kódují tyto nadstavbové proteiny. Postupně jsou tak odhalovány funkční aspekty těchto proteinů.

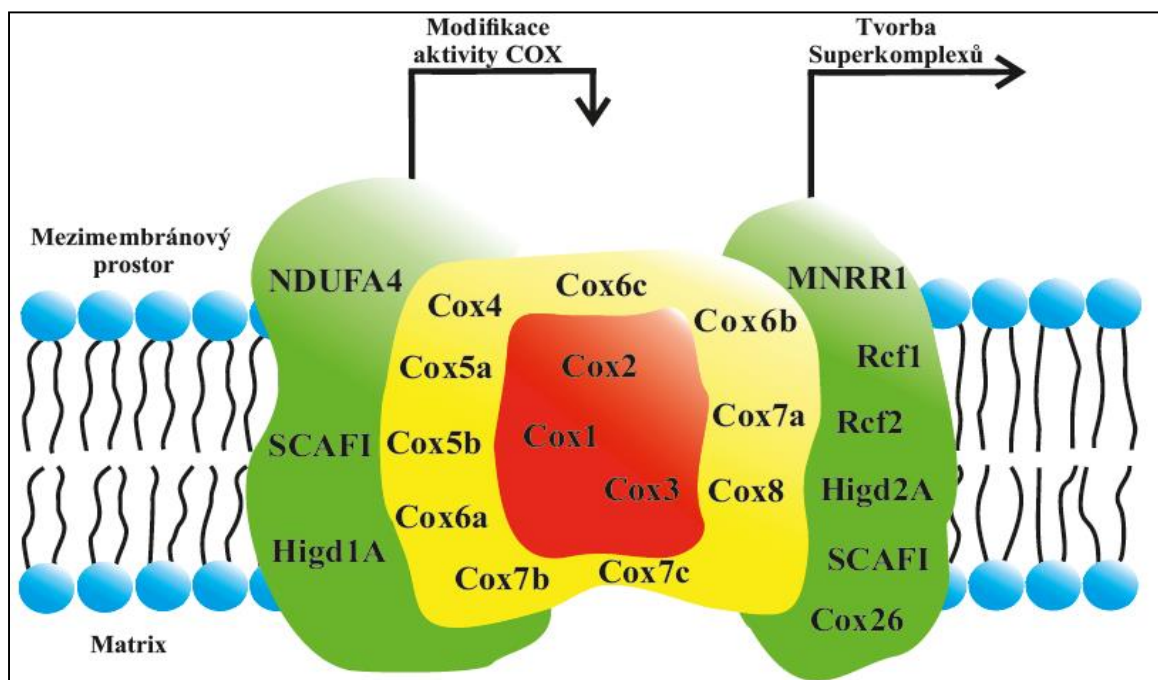
Objevené tkáňové a vývojově specifické podjednotky (Cox4, Cox6a, Cox6b, Cox7a, Cox7b, Cox8) umožňují modulovat COX aktivitu dle potřeb v daných tkáních. H-izoformy podjednotek Cox6a, Cox7a a Cox8, které jsou exprimovány v srdeční tkáni a kosterní svalovině, umožňují jemnou regulaci stechiometrie  $H^+/e^-$ , zatímco L-izoformy jsou exprimovány ve všech tkáních a regulační vliv je u nich potlačen. Třetí skupinou izoform se specifickou tkáňovou expresí jsou podjednotky Cox6b, Cox7b a Cox8, které mají izoformy exprimované specificky v testikulárních tkáních, jejichž funkce není dosud vůbec objasněna.

Nejkontroverznějším tématem se zdá být podjednotka Cox4 a její dvě izoformy. Byla u ní objevena možná regulace exprese jednotlivých izoform Cox4 podjednotky v závislosti na vnějším faktoru, tedy kyslíku. Na přesný mechanismus Cox4-2 exprese existují v současné době přinejmenším dva odlišné pohledy. Podobně je tomu i se samotným vlivem těchto izoform na COX aktivitu, což je také rozporuplné téma zasluhující si další pozornost. Přínosem jistě budou hlubší funkční studie využívající nulové mutace daných genů indukované např. metodou CRISPR, které mohou poukázat na funkci daného proteinu mnohem lépe, nežli mRNA interference, kdy zbylé množství proteinu může ovlivnit výsledky experimentů.

V posledním desetiletí byla objevena řada proteinů asociujících s COX, které nejsou součástí krystalové struktury a nebyly tak pokládány za součást kanonické 13-podjednotkové COX. Přestože se jedná povětšinou o nestechiometrické, slabě vázané podjednotky COX, mají nemalý vliv na fungování COX. Tyto proteiny by se dle doposud objevených funkcí daly rozdělit na dvě skupiny. Jedna skupina proteinů je schopna asociací s COX modulovat její aktivitu, zatímco druhá skupina má roli ve tvorbě a stabilitě COX dimerů a superkomplexů.

Na základě shrnutých poznatků navrhuji pokládat COX za multipodjednotkový komplex se třemi úrovněmi kvartérní struktury (viz obr. 11). První úroveň tvoří katalytické jádro složené z mitochondriálně kódovaných podjednotek Cox1, Cox2 a Cox3. Druhou úroveň představují

silně vázané jaderně kódované podjednotky ve stechiometrickém poměru vůči katalytickému jádru. Tyto vždy přítomné podjednotky jsou doplněny třetí úrovní asociovaných proteinů, které mohou ovlivňovat funkci enzymu přímo i nepřímo v rámci superkomplexů. Výsledně tedy může vznikat několik typů COX s různým množstvím podjednotek a souvisejícím funkčním a interakčním nastavení v rámci respiračního řetězce.



**Obrázek 11: Schéma tří úrovní struktury COX**

Schéma představuje tři úrovně struktury, kdy červeně je zobrazeno katalytické jádro, žlutě jaderně kódované podjednotky a zeleně s COX asociované proteiny.

## 6. Reference

- Abdulhag, U.N. et al., 2015. Mitochondrial complex IV deficiency , caused by mutated COX6B1 , is associated with encephalomyopathy , hydrocephalus and cardiomyopathy. *European Journal of Human Genetics*, 23(2), pp.159–164.
- Abramson, J. et al., 2001. Structure of cytochrome c oxidase: A comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1544(1-2), pp.1–9.
- Acin-Perez, R. et al., 2009. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism*, 9(3), pp.265–276.
- Acin-Perez, R. et al., 2011. Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell Metab.*, 13(6), pp.712–719.
- Andersson, S.G.E. et al., 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396(6707), pp.133–140.
- Anthony, G. et al., 1990. Different isozymes of cytochrome c oxidase are expressed in bovine smooth muscle and skeletal or heart muscle. *FEBS Letters*, 277(1), pp.97–100.
- Anthony, G., Reimann, A. & Kadenbach, B., 1993. Tissue-specific regulation of bovine heart cytochrome-c oxidase activity by ADP via interaction with subunit VIa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(March), pp.1652–1656.
- Aras, S. et al., 2015. Mitochondrion MNRR1 ( formerly CHCHD2 ) is a bi-organellar regulator of mitochondrial metabolism. *MITOCH*, 20, pp.43–51.
- Aras, S. et al., 2013. Oxygen-dependent expression of cytochrome c oxidase subunit 4-2 gene expression is mediated by transcription factors RBPJ, CXXC5 and CHCHD2. *Nucleic Acids Research*, 41(4), pp.2255–2266.
- Arnold, S. & Kadenbach, B., 1997. Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur. J. Biochem.*, 249, pp.350–354.
- Babcock, G.T. & Wikstrom, M., 1992. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature*, 356(6367), pp.301–309.
- Balsa, E. et al., 2012. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metabolism*, 16(3), pp.378–386.
- Baughman, J.M. et al., 2009. A computational screen for regulators of oxidative phosphorylation implicates SLIRP in mitochondrial RNA homeostasis. *PLoS Genetics*, 5(8).
- Bender, E. & Kadenbach, B., 2000. The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Letters*, 466, pp.130–134.
- Bianchi, C. et al., 2004. The Mitochondrial Respiratory Chain Is Partially Organized in a. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(35), pp.36562–36569.
- Blomme, T. et al., 2006. The gain and loss of genes during 600 million years of vertebrate evolution. *Genome Biology*, 7(5), p.R43.
- Boczonadi, V. et al., 2015. Investigating the role of the physiological isoform switch of cytochrome c oxidase subunits in reversible mitochondrial disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 63, pp.32–40.
- Bonne, G. et al., 1993. Expression of human cytochrome c oxidase subunits during fetal development. *Eur. J. Biochem.*, 217, pp.1099–1107.
- Bratton, M.R., Pressler, M.A. & Hosler, J.P., 1999. Suicide Inactivation of Cytochrome c Oxidase: Catalytic Turnover in the Absence of Subunit III Alters the Active Site. *Biochemistry*, 38(49), pp.16236–16245.
- Brzezinski, P. & Larsson, G., 2003. Redox-driven proton pumping by heme-copper oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1605(1-3), pp.1–13.
- Carroll, J. et al., 2003. Analysis of the Subunit Composition of Complex I from Bovine Heart Mitochondria. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(2), pp.117–126.
- Cimmino, M. et al., 1996. Demonstration of in vivo metabolic effects of 3,5-di-iodothyronine. *Journal of Endocrinology*, 149 (2 ), pp.319–325.

- Das, J., Miller, S.T. & Stern, D.L., 2004. Comparison of Diverse Protein Sequences of the Nuclear-Encoded Subunits of Cytochrome C Oxidase Suggests Conservation of Structure Underlies Evolving Functional Sites. *Molecular Biology and Evolution*, 21(8), pp.1572–1582.
- Ewart, G.D., Zhang, Y.Z. & Capaldi, R.A., 1991. Switching of bovine cytochrome c oxidase subunit Via isoforms in skeletal muscle during development. *FEBS*, 292(1,2), pp.79–84.
- Fadda, E., Yu, C.H. & Pom?ts, R., 2008. Electrostatic control of proton pumping in cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1777(3), pp.277–284.
- Fischer, F., Filippis, C. & Osiewacz, H.D., 2015. RCF1-dependent respiratory supercomplexes are integral for lifespan-maintenance in a fungal ageing model. *Scientific reports*, 5(April), p.12697.
- Fontanesi, F. et al., 2006. Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *American journal of physiology. Cell physiology*, 291(June 2006), pp.C1129–C1147.
- Fornuskova, D. et al., 2010. Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b. *Biochem J*, 428, pp.363–374.
- Frank, V. & Kadenbach, B., 1996. Regulation of the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. *FEBS Letters*, 382, pp.121–124.
- Freund, R. & Kadenbach, B., 1994. Identification of tissue-specific isoforms for subunits Vb and VIIa of cytochrome c oxidase isolated from rainbow trout. *Eur. J. Biochem*, 221, pp.1111–1116.
- Fukuda, R. et al., 2007. HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell*, 129(1), pp.111–122.
- Galati, D. et al., 2009. Role of nuclear encoded subunit Vb in the assembly and stability of Cytochrome C oxidase complex: Implications in Mitochondrial dysfunction and ROS Production. *Biochem J*, 420(3), pp.439–449.
- Goldberg, A. et al., 2003. Adaptive evolution of cytochrome c oxidase subunit VIII in anthropoid primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), pp.5873–5878.
- Gupta, K.J., Zabalza, A. & Dongen, J.T. Van, 2009. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiologia Plantarum*, 137, pp.383–391.
- Hallmann, K. et al., 2016. Loss of the smallest subunit of cytochrome c oxidase, COX8A, causes Leigh-like syndrome and epilepsy. *Brain*, 139(2), pp.338–345.
- Hatefi, Y., Haavik, A.G. & Griffiths, D.E., 1962. Studies on the Electron Prens System XLI. Reduced Coenzyme Q (QH<sub>2</sub>)-cytochrome c reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 237(5).
- Hayashi, T. et al., 2015. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(5), pp.1553–1558.
- Henry, R.M. et al., 2009. Functional Hydration and Conformational Gating of Proton Uptake in Cytochrome c Oxidase. *Journal of Molecular Biology*, 387(5), pp.1165–1185.
- Horvat, S., Beyer, C. & Arnold, S., 2006. Effect of hypoxia on the transcription pattern of subunit isoforms and the kinetics of cytochrome c oxidase in cortical astrocytes and cerebellar neurons. *Journal of Neurochemistry*, 99(3), pp.937–951.
- Hosler, J.P. et al., 1993. Insight into the Active-Site Structure and Function of Cytochrome Oxidase by Analysis of Site-Directed Mutants of Bacterial Cytochrome aa<sub>3</sub> and Cytochrome bo. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 25(2), pp.121–136.
- Hüttemann, M., Lee, I., et al., 2012. Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2-knockout mice show reduced enzyme activity , airway hyporeactivity , and lung pathology. *The FASEB Journal*, 26, pp.3916–3930.
- Hüttemann, M., Klewer, S., et al., 2012. Mice deleted for heart-type cytochrome c oxidase subunit 7a1 develop dilated cardiomyopathy. *Mitochondrion*, 12(2), pp.294–304.
- Hüttemann, M., 2000. New isoforms of cytochrome c oxidase subunit IV in tuna fish. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1492, pp.242–246.
- Hüttemann, M., Helling, S., et al., 2012. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(4), pp.598–609.
- Hüttemann, M. et al., 2007. Transcription of mammalian cytochrome c oxidase subunit IV-2 is controlled by a novel conserved oxygen responsive element. *The FEBS journal*, 274(21), pp.5737–48.

- Hüttemann, M., Jaradat, S. & Grossman, L.I., 2003. Cytochrome c Oxidase of Mammals Contains a Testes-Specific Isoform of Subunit VIb — the Counterpart to Testes-Specific Cytochrome c ? *Molecular reproduction and development*, 66(April), pp.8–16.
- Hüttemann, M., Kadenbach, B. & Grossman, L.I., 2001. Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase. *Gene*, 267(1), pp.111–123.
- Hüttemann, M., Schmidt, T.R. & Grossman, L.I., 2003. A third isoform of cytochrome c oxidase subunit VIII is present in mammals q. *Gene*, 312, pp.95–102.
- Hwang, H.J. et al., 2015. Hypoxia Inducible Factors Modulate Mitochondrial Oxygen Consumption and Transcriptional Regulation of Nuclear-Encoded Electron Transport Chain Genes. *Biochemistry*, 54(24), pp.3739–3748.
- Chance, B., Saronio, C. & John S. Leigh, J., 1975. Functional Intermediates in the Reaction of Membrane-bound Cytochrome Oxidases with Oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(24), pp.9226–9237.
- Chance, B. & Williams, G.R., 1955. A Method for the Localization of Sites for Oxidative Phosphorylation. *Nature*, 176, pp.250–254.
- Chazotte, B. & Hackenbrock, C.R., 1989. Lateral Diffusion as a Rate-limiting Step in Ubiquinone-mediated Mitochondrial Electron Transport. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(9), pp.4978–4985.
- Chen, W.-L. et al., 2012. The role of cytochrome c oxidase subunit Va in non-small cell lung carcinoma cells: association with migration, invasion and prediction of distant metastasis. *BMC Cancer*, 12(1), pp.1–13.
- Chen, Y.C. et al., 2012. Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metabolism*, 15(3), pp.348–360.
- Chen, Z.X. & Pervaiz, S., 2010. Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2. *Cell Death Differ*, 17.
- Ikeda, K. et al., 2013. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nature communications*, 4, p.2147.
- Indrieri, A. et al., 2012. Mutations in COX7B Cause Microphthalmia with Linear Skin Lesions , an Unconventional Mitochondrial Disease. *The American Journal of Human Genetics*, 91(5), pp.942–949.
- Iwata, S. et al., 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*, 376(6542), pp.660–669.
- Kadenbach, B. et al., 1995. Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease. *Biochim Biophys Acta.*, 1271, pp.103–109.
- Kadenbach, B. et al., 1983. Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Analytical Biochemistry*, 129(2), pp.517–521.
- Kadenbach, B. et al., 2004. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1655, pp.400–408.
- Kadenbach, B. et al., 1990. Tissue- and species-specific expression of cytochrome c oxidase isozymes in vertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1015(2), pp.368–372.
- Kadenbach, B. & Arnold, S., 1999. A second mechanism of respiratory control. *FEBS Letters*, 447, pp.131–134.
- Kadenbach, B. & Hüttemann, M., 2015. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 24, pp.64–76.
- Kadenbach, B., Ramzan, R. & Vogt, S., 2013. High efficiency versus maximal performance — The cause of oxidative stress in eukaryotes : A hypothesis. *Mitochondrion*, 13, pp.1–6.
- Kaila, V.R., Verkhovsky, M.I. & Wikström, M., 2010. Proton-coupled electron pñenos in cytochrome oxidase. *Chemical reviews*, 110(12), pp.7062–7081.
- Kannt, A. et al., 1999. Mutation of Arg-54 Strongly Influences Heme Composition and Rate and Directionality of Electron Pñenos in *Paracoccus denitrificans* Cytochrome c Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(53), pp.37974–37981.
- Khalimonchuk, O. & Rödel, G., 2005. Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 5, pp.363–388.

- Konstantinov, A.A. et al., 1997. The roles of the two proton input channels in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton p̄renos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(August), pp.9085–9090.
- Krieg, R.C. et al., 2004. Mitochondrial proteome: Cancer-altered metabolism associated with cytochrome c oxidase subunit level variation. *Proteomics*, 4, pp.2789–2795.
- Krzyzosiak, J. et al., 2000. Protein Tyrosine Phosphorylation During Prolonged In Vitro Incubation of Ejaculated Bovine Spermatozoa Is Regulated by the Oxidative State of the Medium 1. *Biology of reproduction*, 62, pp.1615–1623.
- Kwast, K.E., Burke, P. V & Poyton, R.O., 1998. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *The Journal of Experimental Biology*, 201, pp.1177–1195.
- Lang, B.F., Burger, G. & O’Kelly, C.J., 1997. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387, pp.493–497.
- Lanni, A. et al., 1996. Calorigenic effect of diiodothyronines in the rat. *Journal of physiology*, 494(3), pp.831–837.
- Lapiente-Brun, E. et al., 2013. Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science*, 340(6140), pp.1567–1570.
- Lazarou, M. et al., 2009. Assembly of nuclear DNA-encoded subunits into mitochondrial complex IV, and their preferential integration into supercomplex forms in patient mitochondria. *FEBS Journal*, 276(22), pp.6701–6713.
- Lee, H. et al., 2000. Mutations in the Putative H-Channel in the Cytochrome c Oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* Show That This Channel Is Not Important for Proton Conduction but Reveal Modulation of the Properties of Heme a. *Biochemistry*, 39(11), pp.2989–2996.
- Lee, I. et al., 2005. cAMP-dependent Tyrosine Phosphorylation of Subunit I Inhibits Cytochrome c Oxidase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(7), pp.6094–6100.
- Lee, I., Bender, E. & Kadenbach, B., 2002. Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234(1), pp.63–70.
- Lee, I. & Kadenbach, B., 2001. Palmitate decreases proton pumping of liver-type cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.*, 268, pp.6329–6334.
- Levchenko, M. et al., 2016. Cox26 is a novel stoichiometric subunit of the yeast cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(7), pp.1624–1632.
- Liang, H. et al., 2004. A rare polymorphism of the COX7B2 gene in a cantonese family with nasopharyngeal carcinoma. *Science in China Series C: Life Sciences*, 47(5), pp.449–453.
- Linder, D., Freund, R. & Kadenbach, B., 1995. Species-specific expression of cytochrome c oxidase isozymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(3), pp.461–469.
- Little, a G. et al., 2010. Evolution of the nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in vertebrates. *Physiological genomics*, 42(1), pp.76–84.
- Ludwig, B. et al., 2001. Cytochrome c Oxidase and the Regulation of Oxidative Phosphorylation. *ChemBioChem*, 2, pp.392–403.
- Massa, V. et al., 2008. Severe Infantile Encephalomyopathy Caused by a Mutation in COX6B1 , a Nucleus-Encoded Subunit of Cytochrome C Oxidase. *The American Journal of Human Genetics*, 82(June), pp.1281–1289.
- McDonald, A.E., Vanlerberghe, G.C. & Staples, J.F., 2009. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *The Journal of Experimental Biology*, 212, pp.2627–2634.
- McEwen, J.E. et al., 1986. Nuclear Functions Required for Cytochrome c Oxidase Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(25), pp.11872–11879.
- Merle, P. & Kadenbach, B., 1980. On the Heterogeneity of Vertebrate Cytochrome c Oxidase Polypeptide Chain Composition. *Hoppe-Seyler’s Z. Physiol. Chem.*, 361(August), pp.1257–1259.
- Millett, F. et al., 1983. Identification of specific carboxylate groups on cytochrome c oxidase that are involved in binding cytochrome c. *Biochemistry*, 22(3), pp.546–552.
- Mourier, A. et al., 2014. The respiratory Chain supercomplex organization is independent of COX7A2L isoforms. *Cell Metabolism*, 20(6), pp.1069–1075.

- Napiwotzki, J. & Kadenbach, B., 1998. Extramitochondrial ATP / ADP-Ratios Regulate Cytochrome c Oxidase Activity via Binding to the Cytosolic Domain of Subunit IV. *Biol. Chem.*, 379, pp.335–339.
- Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J., 2013. 5 - Respiratory Chains BT - Bioenergetics (Fourth Edition). In Boston: Academic Press, pp. 91–157.
- Nijtmans, L.G.J. et al., 1998. Assembly of cytochrome- c oxidase in cultured human cells. *Eur. J. Biochem*, 254, pp.389–394.
- Oliva, C.R. et al., 2015. Nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunit 4 regulates BMI1 expression and determines proliferative capacity of high-grade gliomas. *Oncotarget*, 6(6), pp.4330–4344.
- Pecina, P. et al., 2004. Genetic defects of cytochrome C oxidase assembly. *Physiological Research*, 53, pp.S213–S223.
- Pfeiffer, K. et al., 2003. Cardiolipin Stabilizes Respiratory Chain Supercomplexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(52), pp.52873–52880.
- Pfützner, U. et al., 1998. Cytochrome c oxidase (heme aa<sub>3</sub>) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 30(1), pp.89–97.
- Pierron, D. et al., 2012. Cytochrome c oxidase: Evolution of control via nuclear subunit addition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817(4), pp.590–597.
- Pitceathly, R.D.S. et al., 2013. NDUFA4 Mutations Underlie Dysfunction of a Cytochrome c Oxidase Subunit Linked to Human Neurological Disease. *Cell Reports*, 3(6), pp.1795–1805.
- Poyton, R. et al., 1996. *Saccharomyces cerevisiae* By has emerged as a useful model for studying both the crosstalk between. *Methods in enzymology*, 260, pp.97–116.
- Radford, N.B. et al., 2002. Cardiac dysfunction in mice lacking cytochrome- c oxidase subunit VIaH. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 282, pp.726–733.
- Ramzan, R. et al., 2010. Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *BBA - Bioenergetics*, 1797(9), pp.1672–1680.
- Ruitenbergh, M. et al., 2000. Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), pp.4632–4636.
- Salje, J., Ludwig, B. & Richter, O.H., 2005. Is a third proton-conducting pathway operative in bacterial cytochrome c oxidase ? *Biochemical Society Transactions*, 33(4), pp.829–831.
- Sampson, V. & Alleyne, T., 2001. Cytochrome c / cytochrome c oxidase interaction - Direct structural evidence for conformational changes during enzyme turnover. *Eur. J. Biochem.*, 268, pp.6534–6544.
- Seagroves, T.N. et al., 2001. Transcription Factor HIF-1 Is a Necessary Mediator of the Pasteur Effect in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 21(10), pp.3436–3444.
- Schäfer, E. et al., 2006. Architecture of Active Mammalian Respiratory Chain. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(22), pp.15370–15375.
- Schägger, H. & Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), pp.1777–1783.
- Singh, S. et al., 2009. Cytochrome c Oxidase Isoform IV-2 is Involved in 3-Nitropropionic Acid-Induced Toxicity in Striatal Astrocytes. *Glia*, 57, pp.1480–1491.
- Strogolova, V. et al., 2012. Rcf1 and Rcf2, members of the hypoxia-induced gene 1 protein family, are critical components of the mitochondrial cytochrome bc<sub>1</sub>-cytochrome c oxidase supercomplex. *Molecular and cellular biology*, 32(8), pp.1363–1373.
- Szklarczyk, R. & Huynen, M.A., 2010. Mosaic origin of the mitochondrial proteome. *Proteomics*, 10, pp.4012–4024.
- Tamiya, G. et al., 2014. A Mutation of COX6A1 Causes a Recessive Axonal or Mixed Form of Charcot-Marie-Tooth Disease. *The American Journal of Human Genetics*, 95(3), pp.294–300.
- Tsukihara, T. et al., 1996. The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *SCIENCE*, 272(31), pp.1136–1144.
- Tzagoloff, A. & Dieckmann, C.L., 1990. PET Genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 54(9), pp.211–225.
- Vukotic, M. et al., 2012. Rcf1 mediates cytochrome oxidase assembly and respirasome formation, revealing heterogeneity of the enzyme complex. *Cell Metabolism*, 15(3), pp.336–347.

- Vygodina, T. V et al., 1997. Proton pumping by cytochrome c oxidase is coupled to peroxidase half of its catalytic cycle. *FEBS Letters*, 412(3), pp.405–409.
- Walker, J.E., 2012. The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, p.S1.
- Weishaupt, A. & Kadenbach, B., 1992. Selective removal of subunit VIb increases the activity of cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 31(46), pp.11477–11481.
- Wikström, M., Verkhovsky, M.I. & Hummer, G., 2003. Water-gated mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1604(2), pp.61–65.
- Williams, L. et al., 2004. Cytochrome c Oxidase Subassemblies in Fibroblast Cultures from Patients Carrying Mutations in COX10 , SCO1 , or SURF1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(9), pp.7462–7469.
- Wittig, I. & Schagger, H., 2005. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*, 5, pp.4338–4346.
- Yang, W.-L. et al., 1998. Novel Function of the Regulatory Subunit of Protein Kinase A: Regulation of Cytochrome c Oxidase Activity and Cytochrome c Release. *Biochemistry*, 37(40), pp.14175–14180.
- Yoshikawa, S. et al., 1998. Redox-Coupled Crystal Structural Changes in Bovine Heart Cytochrome c Oxidase. *SCIENCE*, 280(June), pp.1723–1729.